

**NEUE METHODEN
ZUR ISOLIERUNG DER MITOCHONDRIALEN
ATMUNGSKETTENKOMPLEXE II UND III UND DER
CYTOCHROM b – UNTEREINHEIT DES KOMPLEX III**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von
HERMANN SCHÄGGER
aus Weilheim i. OB

München

1980

1981

**NEUE METHODEN
ZUR ISOLIERUNG DER MITOCHONDRIALEN
ATMUNGSKETTENKOMPLEXE II UND III UND DER
CYTOCHROM b – UNTEREINHEIT DES KOMPLEX III**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians Universität München**

vorgelegt von

HERMANN SCHÄGGER

aus Weilheim i. OB

München

1980



1. Berichterstatter : Prof. Dr. G. von Jagow

2. Berichterstatter : Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 21. 1. 1981

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1976 bis Juni 1980 auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. von Jagow am Institut für Physikalische Biochemie der Ludwig-Maximilians Universität München durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. von Jagow herzlich für das Interesse an meiner Arbeit und für die sowohl fachliche, als auch moralische Unterstützung.

Für die Durchführung der Ultrazentrifugationsstudien, der Aminosäureanalysen und der Proteinsequenzierung danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. H. J. Kolb, Frl. J. Drechsel, Herrn Priv. Doz. Dr. W. Machleidt und Frau Dr. I. Machleidt.

Herrn Prof. Dr. E. M. Klingenberg und den Mitarbeitern seines Lehrstuhls, insbesondere Herrn Dr. H. Hackenberg danke ich für wertvolle Diskussionsbeiträge und den offenen Austausch präparativer und analytischer Erfahrung.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. von Jagow, Herrn W.D. Engel und Herrn W. Becker für ihre Hilfsbereitschaft und die anregende Zusammenarbeit.

Für die tatkräftige Hilfe bei der experimentellen Arbeit danke ich Frl. Christina Michalski und Frau Ilse Prinz und vor allem Frl. Isabell Werkmeister, die in unermüdlicher, zuverlässiger und interessierter Mitarbeit die oft zermürende präparative Arbeit erträglich machte.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	Seite
1.1. Aufbau der mitochondrialen Atmungskette	
1.1.1. Komplex II	3
1.1.2. Komplex III	4
1.2. Zielsetzung der Arbeit	6
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1. Materialien und präparative Methoden	8
2.2. Analytische Methoden	9
3. ERGEBNISSE	
3.1. Differentielle Auflösung der Membranproteine von Rinderherzmitochondrien	14
3.1.1. Negative Extraktion zur Anreicherung des Komplex III	
3.1.1.1. Extraktion bei variabler NaCl-Konzentration	15
3.1.1.2. Extraktion bei variabler Triton-Konzentration	17
3.1.1.3. Extraktion durch Ammoniumsulfat oder Ultraschall	19
3.1.2. Solubilisierung des Komplex III	
3.1.2.1. Solubilisierung aus vorextrahierten Mitochondrien	19
3.1.2.2. Solubilisierung aus Mitochondrien	22
3.2. Isolierung und Charakterisierung des Komplex III	23
3.2.1. Isolationsgang	
3.2.1.1. Antimycinbindung zur Stabilisierung der Proteinstruktur	24
3.2.1.2. Chromatographie an Hydroxyapatit	25
3.2.1.3. Präparative Varianten der Komplex III-Isolierung	28
3.2.2. Charakterisierung des Komplex III	32

3.2.2.1. Polypeptid - und Aminosäurezu - sammensetzung	32
3.2.2.2. Hydrodynamische Eigenschaften	36
3.2.2.3. Spektrale und potentiometrische Eigenschaften	42
3.2.2.4. Antimycinbindung und Stabilität	50
3.3. Isolierung und Charakterisierung des Cyto- chrom b aus dem Komplex III	
3.3.1. Isolationsgang	51
3.3.2. Charakterisierung des Cytochrom b	
3.3.2.1. Polypeptid - und Aminosäurezu - sammensetzung	57
3.3.2.2. Hydrodynamische Eigenschaften	59
3.3.2.3. Spektrale und potentiometrische Eigenschaften	62
3.3.2.4. Antimycinbindung und Stabilität	65
3.4. Anreicherung weiterer Untereinheiten des Komplex III	
3.4.1. Präparation des Cytochrom c ₁	68
3.4.2. Präparation der Core - Proteine	74
3.4.3. Präparation des MG-12-Proteins	76
3.5. Isolierung und Charakterisierung des Komplex II	
3.5.1. Isolationsgang	77
3.5.2. Charakterisierung des Komplex II	
3.5.2.1. Zusammensetzung des Komplex II	80
3.5.2.2. Spektrale und potentiometrische Eigenschaften	83
3.5.2.3. Elektronentransportaktivität und Stabilität	85
4. DISKUSSION	
4.1. Wechselwirkung von Proteinen mit Hydroxy- apatit	86
4.2. Isolierung und Charakterisierung des Komplex III	88
4.3. Isolierung und Charakterisierung des Cytochrom b aus Komplex III	91

4.4. Isolierung und Charakterisierung des Komplex II	98
5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	100
6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	101
7. LITERATURVERZEICHNIS	102

1. EINLEITUNG

1.1. Aufbau der mitochondrialen Atmungskette

Die an der oxidativen Phosphorylierung in Säugetier-mitochondrien beteiligten Proteine sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, die zu etwa 70 % aus Protein und zu etwa 30 % aus Lipiden besteht (1).

Die Mitochondrien können in sogenannte Submitochondriale Partikel (SMP) zerlegt werden, die noch geschlossene, intakte Membranvesikel darstellen (2). Beim Elektronentransport von NADH zu Sauerstoff können sie ATP bilden. Eine systematische Fraktionierung der inneren Membran von Rinderherzmitochondrien mit Hilfe von Detergentien führte 1961 zu dem Ergebnis, daß das mitochondriale Elektronentransportsystem in vier Multiproteinkomplexe, Cytochrom c und Ubichinon-10 fragmentiert werden kann (3) . Die vier Komplexe weisen folgende katalytischen Eigenschaften auf.

Komplex I : NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase

Komplex II : Succinat-Ubichinon- Oxidoreduktase

Komplex III: Ubichinol-Ferricytochrom c-Oxidoreduktase

Komplex IV : Ferrocytochrom c-Sauerstoff-Oxidoreduktase

Da die Komplexe kein geschlossenes intaktes Membransystem bilden, können sie zwar noch den Elektronentransport katalysieren, jedoch nicht mehr die Phosphorylierung von ADP zu ATP. Die relative Stabilität dieser Fragmente und das konstante Verhältnis ihrer Komponenten legte die Vermutung nahe, daß diese Komplexe strukturelle und funktionelle Einheiten darstellen. In frühen Untersuchungen wurde auch gezeigt, daß die Komplexe I-IV zusammen mit Cytochrom c, das bei der Fraktionierung abgetrennt wurde, wieder rekombiniert werden können ; dabei kann das gesamte Elektronen-

transportsystem mit den erwarteten Elektronentransportaktivitäten und den entsprechenden Einwirkungen der Inhibitoren wiederhergestellt werden (3). Das relativ kleine, bewegliche Ubichinon-10-Molekül verknüpft die Komplexe I und II mit Komplex III (4), während das periphere Membranprotein Cytochrom c wahrscheinlich über laterale Diffusion den Komplex III mit Komplex IV verknüpft (5). Die isolierten Komplexe I, III und IV zeigen nach Einbau in Phospholipidvesikel die Eigenschaft, unter Substratoxidation den Protonentransport über die Membran zu katalysieren, während dem Komplex II diese Eigenschaft fehlt. 1968 konnte ein fünfter Enzymkomplex (K - V) aus der inneren Mitochondrienmembran isoliert werden (6), dessen Funktion die ATP-Synthese unter Verbrauch der von der Atmungskette gelieferten Energie ist. Im isolierten Zustand katalysiert der K - V die Oligomycin-empfindliche ATP-Hydrolyse und den Austausch der γ -Phosphatgruppe im ATP gegen Phosphat (7,8). Der Mechanismus der Redox-Energie-getriebenen ATP-Bildung konnte noch nicht in seinen Details geklärt werden. Die zahlreichen, teils widersprüchlichen experimentellen Daten führten zu drei verschiedenen Hypothesen des Reaktionsmechanismus (9,10), der chemischen- (11), der konformativen- (9,12,13) und der chemiosmotischen Hypothese (14,15).

Die Verfügbarkeit von isolierten, gereinigten Komplexen, deren Eigenschaften, verglichen mit den noch in der Mitochondrienmembran inkorporierten Enzymkomplexen in vieler Hinsicht unverändert sind, war eine notwendige Voraussetzung für eine detailliertere Untersuchung der Struktur und Funktion der einzelnen Segmente. Da die vorliegende Arbeit sich ausschließlich mit den Komplexen II und III beschäftigt, seien hier nur der Aufbau und die Funktion dieser beiden Komplexe kurz umrissen.

1.1.1. Aufbau des Komplex II

Der Komplex II (K-II) katalysiert die Oxidation von Succinat durch Ubichinon. Die Reaktion wird gehemmt durch Thiol-Inhibitoren, Thenoyltrifluoraceton und kompetitive Hemmstoffe wie Oxalacetat und Malonat (16). Der K-II besteht aus vier Proteinuntereinheiten mit folgenden Molekulargewichten (17,18) : 70 000, 27 000, 15 000 und 13 000. Die beiden größeren Proteine gehören zur sogenannten löslichen Succinatdehydrogenase, die sich mit Hilfe chaotroper Agentien abspalten läßt (19,20). Sie kann jedoch Ubichinon nicht mehr als Elektronen-acceptor verwenden. Als artifizielle Elektronenacceptoren werden Farbstoffe wie Phenazinmethosulfat oder Ferri-cyanid verwendet. Das Cytochrom b des K-II (Cyt.b_{II}) mit einem niedrigen Redoxpotential von etwa - 200 mV (1) muß ebenso wie die Ubichinon-Bindungsstelle (21, 22,23,24) den beiden kleinen Proteinen zugeordnet werden. Welche Komponente letztlich das Häm trägt ist noch nicht klar (25,26). Das Cyt.b_{II} wird nicht durch Succinat reduziert, jedoch wird seine durch Dithionit reduzierte Form schnell durch Fumarat und etwas langsamer durch Ubichinon-2 oxidiert (27). Die Funktion des Cyt. b_{II} ist noch nicht klar. Das mit - 200 mV sehr negative Mittelpotential scheint eine Beteiligung am Elektronentransport vom Succinat zum Ubichinon auszuschließen. Aus diesem Grund wurde vermutet, daß dieses Cytochrom an anderen Stoffwechselwegen beteiligt sein könnte oder eine regulatorische Funktion für den Elektronenfluß haben könnte (28,3). Dasselbe trifft auch für das FeS_(S-2)-Zentrum (siehe unten) zu. Ein FAD-Molekül ist an die 70 000 D-Untereinheit kovalent gebunden (29, 30). Außerdem sind in dieser Untereinheit zwei Eisen-Schwefel-Zentren vom Fe₂S₂-Typ (FeS_(S-1) und FeS_(S-2)) zu finden. Die Untereinheit mit dem Molekulargewicht von 27 000 ist ebenfalls ein Eisen-Schwefel-Protein, trägt

jedoch nur ein FeS-Zentrum vom Fe_4S_4 -Typ ($\text{FeS}_{(S-3)}$) (31,32,33,34). Der Komplex II unterliegt einem Regulationsmechanismus (35). Es existieren mindestens zwei Formen des Enzyms. Die inaktive Form wird durch Oxalacetat stabilisiert, das in einer 1 : 1 - Stöchiometrie an den Komplex bindet (36,37). Der K-II kann durch aktivierende Liganden wie ClO_4^- , NO_3^- , Br^- (38, 39), ATP (40), Ubichinol (41), Succinyl-CoA (42) und einige Dicarbonsäuren (43) in die aktive Form überführt werden. Ein großer Unterschied zwischen aktiver und inaktiver Form zeigt sich im Mittelpotential des FAD. Es fällt von 0 mV in der aktiven Form auf -190 mV in der inaktiven Form. Als Erklärung wird ein Übergang der planaren Konfiguration des Flavins zu einer gespannten Form angenommen (35). Für die Cyt. b_{II} -Untereinheit und das Eisen-Schwefel-Zentrum $\text{FeS}_{(S-2)}$ existieren noch keine derartigen Redoxpotential-Untersuchungen. Der K-II ist empfindlich gegen SH-blockierende Agentien ; die reaktiven SH-Gruppen können durch Substrate und kompetitive Inhibitoren geschützt werden (44). Der Komplex II ist eine der Eintrittsstellen von Reduktionsäquivalenten für die Atmungskette. Eine allosterische Regulierung dieser Schlüsselposition ist deshalb nicht überraschend.

1.1.2. Aufbau des Komplex III

Der Komplex III (K-III) katalysiert die Oxidation von Ubichinol durch Cytochrom c. Diese Reaktion wird spezifisch gehemmt durch Antimycin A und 2-Alkyl-4-hydroxychinolin-N-oxid (45). Der K-III besteht aus mindestens 8 Polypeptiden und hat ein minimales Molekulargewicht von 200 000-250 000 (46-48). Eine Aufgliederung des Komplexes in seine Untereinheiten führt zu einer irreversiblen Veränderung seiner Eigenschaften

einschließlich der katalytischen Aktivitäten (48). Trotzdem wurde und wird die möglichst schonende Isolierung der einzelnen Proteinuntereinheiten angestrebt, da die Möglichkeit besteht, mit Hilfe von Rekonstitutionsexperimenten einen besseren Einblick in die Funktion der einzelnen Proteine und des gesamten Komplexes zu erhalten.

Die zwei größten Polypeptide, denen mittels SDS-PAGE Molekulargewichte von etwa 50 000 zugeordnet werden, werden traditionell als Core-Proteine bezeichnet (49). Sie tragen keine Redoxzentren, jedoch ist neben ihrer strukturellen Funktion auch eine andere Funktion wie z.B. die Ausbildung eines Protonenkanals denkbar (1). Redoxzentren sind nur bei den Proteinen zu finden, denen über SDS-PAGE Molekulargewichte von 25 000 bis 35 000 zugeordnet werden. Dem Rieske Eisen-Schwefel-Protein (48,52, 53) mit einem Fe_2S_2 -Zentrum wird ein MG um 25 000, dem Cytochrom c_1 mit kovalent gebundenem Häm ein MG von 26 000 bis 33 000 zugeordnet (54,55). Für das Cytochrom b ($\text{Cyt.}b_{\text{III}}$) mit nicht kovalent gebundenem Häm ist eine Molekulargewichtszuordnung mittels SDS-PAGE nur bei gleichzeitiger Angabe des verwendeten Gelelektrophoresesystems sinnvoll, da bei diesem Protein eine starke Abhängigkeit von der Polyacrylamid-Konzentration zu beobachten ist (50, 51, 47). Bei Verwendung von Gelen mit 10-15 % Polyacrylamid wird dem $\text{Cyt.}b_{\text{III}}$ üblicherweise ein MG um 30 000 zugeordnet. Nachdem über Pyridinhämochromogenmessungen zwei Mol Häm b pro Mol Häm c_1 gemessen werden, wird allgemein eine Stöchiometrie von zwei Molekülen $\text{Cyt.}b_{\text{III}}$ pro Molekül $\text{Cyt.}c_1$ angenommen. Die drei bis vier kleinen Polypeptide, denen mittels SDS-PAGE Molekulargewichte kleiner als 14 000 zugeordnet werden (56) besitzen kein Redoxzentrum. Von den Komponenten des K-III wurden bereits das FeS-Protein (52,53), die Core-Proteine (57), das $\text{Cyt.}c_1$ (55,58) und das $\text{Cyt.}b$ isoliert (59-64).

1.2. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung schonender und einfacher Präparationsverfahren zur Isolierung der Komplexe II und III und der Untereinheiten des K-III, insbesondere der beiden b-Typ-Cytochrome des K-III, die auch als Cytochrom b_T und b_K bezeichnet werden und im folgenden nun als Cyt. b_{III} bezeichnet werden sollen.

Eine neue Präparationsmethode für den Komplex III erschien aus folgenden Gründen notwendig :
Da alle bisherigen Präparationsmethoden des K-III nach einem einzigen generell angewandten Schema, nämlich einer Reihe von Ammoniumsulfat-Fällungen nach Solubilisierung der Proteine mit Salzen von Gallensäuren durchgeführt worden waren, war nicht auszuschließen, daß die Beobachtung eines aus mindestens 8 Proteinuntereinheiten bestehenden K-III auf einen präparationsbedingten Artefakt zurückzuführen ist. Die Entwicklung einer nach anderen Trennprinzipien arbeitenden Präparationsmethode sollte zeigen, ob gewisse Proteinuntereinheiten des nach den bisherigen Methoden präparierten K-III Verunreinigungen infolge von Copräcipitationen sind.

Eine Voraussetzung für die Präparation der Untereinheiten des K-III ist die Verfügbarkeit einer einfachen Präparationsmethode, die es erlaubt, den K-III frei von Verunreinigungen in größeren Mengen zu isolieren. Die bisherigen Methoden erfüllten diese Ansprüche nur teilweise. Nach diesen Methoden ließen sich zwar ausreichende Mengen eines bis zu 20 % durch Fremdproteine verunreinigten K-III präparieren (45,103-105);

die Weiterreinigung bis zur Stufe der elektrophoretischen Reinheit verringerte jedoch die Ausbeute in einem für unsere Zwecke nicht vertretbaren Ausmaß.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Entwicklung einer Methode zur schonenden Isolierung der Untereinheiten des K-III, vor allem des Cyt.b_{III}. Diese Präparation sollte die Voraussetzung zur Beantwortung folgender Fragen schaffen :

Ist der Hemmstoff Antimycin nach der Spaltung des K-III in seine Protein-Untereinheiten noch an eine Komponente gebunden ?- Wenn ja - Welche Untereinheit ist als Antimycin-Bindungsstelle anzusehen ?

Gibt es tatsächlich zwei in der Aminosäuresequenz verschiedene b-Typ-Cytochrome in K-III oder ist das Auftreten von zwei verschiedenen Absorptionsspektren und von zwei verschiedenen Mittelpotentialen des Cyt.b_{III} im intakten K-III (28,48,65,66) auf andere Einflüsse wie z.B. eine cooperative Wechselwirkung der beiden b-Typ-Cytochrome oder eine unterschiedliche Umgebung der beiden Proteine zurückzuführen ?

Eine weitere Aufgabe war die Entwicklung eines neuen Reinigungsverfahrens für den K-II, der als idealer Donor von Redoxäquivalenten für den K-III und als Ausgangsmaterial für zukünftige Cyt.b-Präparationen aus K-II dienen soll.

Das Fernziel dieser Arbeit ist die Verwendung der neuentwickelten Präparationen für Rekonstitutionsexperimente, um zu einem besseren Verständnis des Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung zu gelangen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und präparative Methoden

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
^3H -Triton X-100	Geschenk der Fa. Rohm und Haas (Philadelphia)
^3H -Antimycin A	Geschenk von Dr. Bremer (Hoechst)
Triton X-100 (für die Scintillationstechnik)	Serva
Na-Dodecylsulfat (reinst)	"
Na-Cholat (für die Mikrobiologie)	Merck
Antimycin A (krist.)	Boehringer
Thenoyltrifluoracetone (p.A.)	Merck
Albumin (Rinderserum)	Behringwerke
Albumin (Hühnerei)	Boehringer
Laktatdehydrogenase (Schweine-muskel)	"
Aprotinin (Rinderlunge)	"
Pyruvatkinase (Kaninchen-muskel)	"
Ferritin (Pferdemicke)	"
Katalase (Rinderleber)	"
Hexokinase (Hefe)	"
Aldolase (Kaninchenmuskel)	"
α - Chymotrypsinogen A (Rinderpankreas)	Sigma
β - Laktoglobulin A (Milch)	"
Phosphorylase A (Kaninchen-muskel)	"
Cytochrom c (Pferdeherz)	"
Dextranblau	Serva
Sephadex G-25, G-100, G-150, G-200	Pharmacia
Sephacel 6B-C1 und 4B-C1	"
DEAE-Sephacel	"
Ultrogel AcA 34	LKB
Membranfilter (Druckfiltration)	Amicon

Hydroxyapatit wurde nach Tiselius (67) wie von Bernardi beschrieben (68) selbst hergestellt. Mitochondrien aus Rinderherz wurden nach Smith (69) präpariert und unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Submitochondriale Partikel wurden wie beschrieben (70) präpariert.

2.2. Analytische Methoden

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach Lowry et al. (71) oder nach Beisenherz et al. (72). Bei Anwendung der Lowry-Methode wurde SDS zugegeben, um eine Ausfällung des Triton zu vermeiden (73). Phosphat wurde nach der Methode von Chen et al. (74) oder, wenn die Bestimmung auf Dünnschichtplatten notwendig war nach Keenan et al. (75) gemessen . Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten mit 0,25 mm Schichtdicke. Als Fließmittel wurde eine 65 : 25 : 4 - Mischung aus Chloroform, Methanol und Wasser verwendet.

Triton wurde nach Garewal (76) bzw. direkt über die Absorption bei 280 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 23,2$) analysiert. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach Neville und Glossmann (77). Es wurden Gele (5x100 mm) mit 17 % Acrylamid und 0,75 % Quervernetzer verwendet. Die Polymerisierung erfolgte bei Raumtemperatur durch Zugabe von 30 mg Ammoniumperoxodisulfat und 75 µl Tetramethylethyldiamin pro 70 ml. Die Gele wurden mit Coomassie-Blue-G-250 (Serva) angefärbt. Flavin wurde nach Hatefi und Stempel bestimmt (78). Ubichinon wurde nach Kröger (79) bestimmt.

Säurelabiler Schwefel wurde nach Fogo und Popowsky (80) in der Modifikation von King und Morris (81) gemessen. Die Bestimmung des Nicht-Häm-Eisens erfolgte nach Brumby und Massey (82). Die Häm b, a und c-Gehalte

wurden nach Basford et al. (83) durch Bestimmung der Pyridinhämochromogene ermittelt. Durch Vergleich der Pyridinhämochromogenbestimmungen mit den Lichtabsorptionsspektren der nativen, Häm-tragenden Proteine konnten die entsprechenden Extinktionskoeffizienten bestimmt werden. Elektronentransportaktivitäten wurden an einem Doppelstrahlphotometer gemessen. Der Testansatz für die Messung der Succinat-DCIP-Reduktase-Aktivität war wie folgt :

Testpuffer : 50 mM NaPi pH 7,0

0,1 mM EDTA

5 mM NaN_3

Testansatz : 1 ml Testpuffer

+20 μl Na-Succinat (1 M, pH 7)

+20 μl DCIP (0,1 %)

+ 5 μl Ubichinon-1 (5 mM)

Start : 1-5 μl K-II (0,1-0,5 μg Protein)

Stop : 5 μl Thenoyltrifluoracetone (200 mM)

Messung : 610 - 750 nm ; 37°C ;

($\epsilon_{\text{DCIP, 610-750 nm; red.-ox.}} = 20 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

Lichtabsorptionsspektren wurden, falls klare Lösungen vorlagen, an einem Cary 118 - Spektrometer bei Raumtemperatur durchgeführt. Lagen trübe Lösungen vor oder waren Tieftemperaturspektren erforderlich, so wurden diese an einem von M. Klingenberg nach B. Chance speziell für trübe Lösungen entworfenen Split-Beam-Spektrophotometer (84) aufgenommen. Die Redoxpotentialmessungen wurden von G. von Jagow nach der Methode von Dutton und Wilson (85) und mit einer von G. von Jagow entworfenen speziellen Redoxtitrationskammer durchgeführt. Die Methoden zu den Ultrazentrifugationsstudien von H.J. Kolb und J. Drechsel und den von Machleidt und Machleidt durchgeführten Aminosäureanalysen sind in (86) und (51) beschrieben. Die Polarität der Proteine

wurde nach Capaldi und Vanderkooi (87), das partielle spezifische Volumen nach Cohn und Edsall (88) berechnet. Zur Endgruppenbestimmung des Cyt. b_{III} wurde das Apoprotein, das in SDS vorlag, kovalent an mit p-Phenylendiisocyanat aktivierte Glaskügelchen gebunden (89). Das Protein wurde anschließend in der in (90) beschriebenen Art und Weise mittels einer Fest-Phasen-Sequenziertechnik abgebaut. Die entstandenen Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden gaschromatographisch identifiziert. Die Stokes-Radien der in Triton solubilisierten Präparationen wurden durch Gelfiltration an Sepharose 6B-C1 (1 x 100 cm) bestimmt (91-95). Die Säule war äquilibriert mit 0,05 % Triton, 200 mM NaCl, 10 mM Mops und 1 mM NaN₃ pH 7,2. Wasserlösliche Proteine mit bekannten Stokes-Radien, die kein Triton binden (93,96) wurden zur Eichung verwendet (siehe Abb.10). Das Ausschlußvolumen v_o der Säule wurde mit Blue Dextran (Pharmacia), das Totalvolumen v_t mit ³H₂O bestimmt. Das Elutionsvolumen v_e der einzelnen Proteine kann zusammen mit v_o und v_t zur Berechnung eines K_{av} -Wertes benutzt werden, der einen Vergleich des Elutionsverhaltens auf verschieden dimensionierten Säulen erlaubt.

$$K_{av} = v_e - v_o / v_t - v_o \quad (93) \quad (I)$$

Die Diffusionskoeffizienten der Proteine können aus den gemessenen Stokes-Radien berechnet werden (97).

$$\text{Einstein-Stokes - Gleichung : } D = \frac{kT}{6 \pi \eta R_s} \quad (II)$$

D : Diffusionskoeffizient (cm² sec⁻¹)

k : Boltzmannkonstante ; 1,38 10⁻¹⁶ (g cm² sec⁻² K⁻¹)

T : Absolute Temperatur (K)

R_s : Stokes-Radius (cm)

η : Viskosität des Lösungsmittels (g cm⁻¹ sec⁻¹)

Der Sedimentationskoeffizient wurde aus

$$s = \frac{d \ln r / dt}{60 \omega^2} \quad (III)$$

berechnet, wobei r der Abstand des wandernden Proteins vom Rotationszentrum und ω die Winkelgeschwindigkeit ist.

Aus dem Sedimentations- und dem Diffusionskoeffizienten läßt sich das unkorrigierte Molekulargewicht wie folgt berechnen.

$$\text{Svedberg-Gleichung} : M' = \frac{s R T}{D (1 - \bar{v}' \rho_{LM})} \quad (IV)$$

M' : unkorrigiertes Molekulargewicht des Protein-Detergens-Komplexes (g)

s : Sedimentationskoeffizient (sec)

R : Allgemeine Gaskonstante ; $8,3 \cdot 10^7$ (g cm²sec⁻²K⁻¹)

$\bar{v}'$: Partielles spezifisches Volumen des Protein-Detergens-Komplexes (ml/g)

ρ : Dichte des Lösungsmittels (g/ml)

Das partielle spezifische Volumen des Protein-Detergens-Komplexes läßt sich nach Tanford (96) aus den partiellen spezifischen Volumina $\bar{v}$ der einzelnen Bestandteile und ihrer jeweiligen Gewichtsanteile x berechnen.

$$\bar{v}' = x_{\text{Prot.}} \bar{v}_{\text{Prot.}} + x_{\text{Det.}} \bar{v}_{\text{Det.}} \quad (V)$$

$$(\bar{v}_{\text{Triton}} = 0,91 \text{ ml/g})$$

Das korrigierte Molekulargewicht (M) des Proteins wird nach Tanford (96) berechnet.

$$M = \frac{M'}{1 + \delta_{\text{Det.}}} \quad (VI)$$

$$\delta_{\text{Det.}} = \frac{\text{Masse des gebundenen Detergens}}{\text{Masse des Proteins}}$$

Aus Sedimentationsgleichgewichtsläufen wurde das Molekulargewicht über folgende Gleichung errechnet.

$$M' = \frac{2RT \left(\frac{d \ln A}{dr^2} \right)}{\omega^2 (1 - \bar{v}' \rho_{LM})} \quad (VII)$$

A : Schreiberauslenkung in mm (proportional zur Absorption)

$\bar{v}'$ und M wurden wie in Gleichung (V) und (VI) berechnet.

Das Molekulargewicht des Cyt.c₁ wurde aus dem Sedimentations- und dem Diffusionskoeffizienten berechnet (98-101), während die Molekulargewichte des K-III' und des Cyt.b_{III} aus Hochgeschwindigkeits-Sedimentations-Gleichgewichtsläufen ermittelt wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Differentielle Auflösung der Membranproteine von Rinderherzmitochondrien

Die mitochondrialen Proteine werden eingeteilt in die wasserlöslichen Matrixproteine (etwa 50 %) und die membrangebundenen Proteine. Bedingungen, die zur Öffnung der Membran führen setzen die Matrixproteine frei. Eine weitere partielle Solubilisierung der Lipidmembran sollte zu einer Anreicherung des K-III führen und damit die darauffolgende chromatographische Reinigung unterstützen.

3.1.1. Negative Extraktion zur Anreicherung des K-III

Bei den Extraktionsexperimenten wurde bestimmt, wieviel Prozent der eingesetzten K-II-, K-III-, K-IV- und Proteinmengen extrahierbar sind. Die Bestimmung des extrahierten Proteins erfolgte nach Lowry (71); der K-II wurde über die Messung der Succinat-DCIP-Reduktase-Aktivität bestimmt. Der Komplex III ließ sich nicht enzymatisch messen, da die vorgegebenen Triton-Konzentrationen die Messung der Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität stören. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung des K-III spektrophotometrisch unter Berücksichtigung der überlagerten Absorption des K-II. Hierbei wurde von der Annahme ausgegangen, daß in Mitochondrien 20 % der Absorption bei 560 nm (Differenzspektrum : 560-575 nm; reduziert minus oxidiert) auf die Absorption des K-II zurückzuführen sind. K-IV wurde ebenfalls spektrophotometrisch bestimmt (Differenzspektrum : 603-635 nm ; red.-ox.) (102).

3.1.1.1. Extraktion bei variabler NaCl-Konzentration

Die aufgetauten Mitochondrien wurden 10 Min. bei 25 000 g zentrifugiert und das Überstehende Präparationsmedium (0,25 M Sucrose, 0,5 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7,4) dekantiert, um die Sucrose-Konzentration bei den Auflösungsversuchen niedrig zu halten. Nach dem Verdünnen mit Pufferlösung (20 mM Mops, 1 mM NaN_3 pH 7.2) wurde Triton X-100 aus einer Stammlösung (20 %) zugegeben und nach kurzem Rühren (1 Min.) NaCl aus einer Stammlösung (4 M) zugetropft. Die Endkonzentrationen sind in Tab.1 angegeben.

Extraktion	Protein (mg/ml)	optimale Tritonkonz. (%)	optimale NaCl-Konz. (M)	Ammonium- sulfat (M)
(3.1.1.1.)				
bei variabl.	10	1,0	0,6	-
NaCl-Konz.	25	2,0	0,6	-
(3.1.1.2.)				
bei variabl.	20	1,5	0,6	-
Tritonkonz.	20	2-2,5	0,2	-
(3.1.1.3.)				
mit Ammon- sulfat	15	1,0	-	0,04

Tab.1 Zusammenstellung der Vorextraktionsversuche

Wenn bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml und einer konstanten Triton-Konzentration von 1 % gearbeitet wird, liegt die optimale NaCl-Konzentration bei 0,6 M. Unter diesen Bedingungen werden 45 % des Gesamtproteins extrahiert. Die Anteile der solubilisierten Komplexe III und IV sind vernachlässigbar.

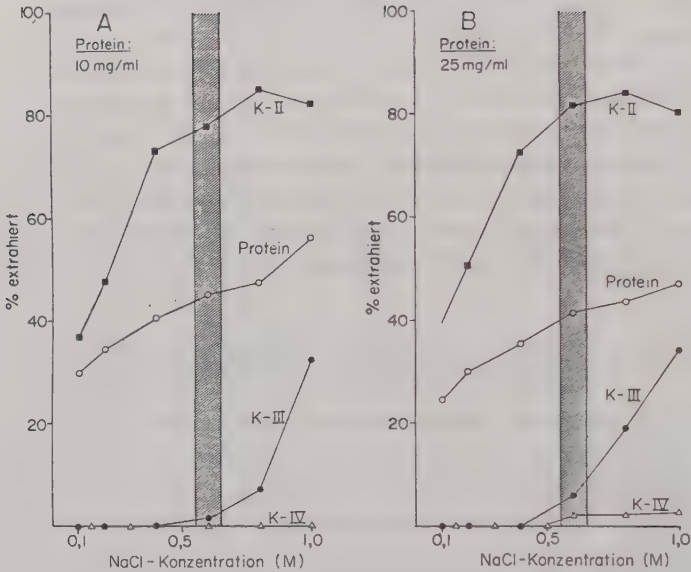


Abb.1 Negative Extraktion bei variabler NaCl-Konzentration und einer Protein-Konzentration von 10 mg/ml (A) bzw. 25 mg/ml (B). Die Triton-Konzentration in (A) ist konstant bei 1 %, in (B) konstant bei 2 %.

- K-II (Succinat-DCIP-Reduktase-Aktivität)
- K-III (560-575 nm ; Red.-Ox.-Differenzspektrum)
- △—△ K-IV (603-635 nm ; Red.-Ox.-Differenzspektrum)
- Protein (Lowry)

Die schraffierten Flächen zeigen den Bereich der optimalen Auflösung.

Eine weitere Erhöhung der NaCl-Konzentration bei der vorgegebenen Protein- und Triton-Konzentration kann nicht vorgenommen werden, da dies zur Solubilisierung des K-III führt.

Für K-III-Präparationen im größeren Maßstab ist wegen der begrenzten Kapazität der Rotoren eine modifizierte Vorextraktion bei höherer Protein-Konzentration (25 mg/ml) erforderlich. In diesem Fall wurde mit 2 % Triton gearbeitet. Die optimale NaCl-Konzentration lag auch hier bei 0,6 M (siehe Tab.1 und Abb. 1 B). Der Übergang von der Extraktion des K-II zur Extraktion des K-III ist allerdings fließend, falls bei der höheren Protein-Konzentration von 25 mg/ml gearbeitet wird. Es zeigte sich außerdem, daß die Sedimente umso fester und die Überstände umso besser dekantierbar waren, je geringer die verwendete NaCl-Konzentration war. Aus diesem Grund wurden analoge Auflösungsversuche bei variabler Triton- und konstanter NaCl-Konzentration durchgeführt.

3.1.1.2. Extraktion bei variabler Triton-Konzentration

Die Mitochondriensuspension wurde wie unter 3.1.1.1. behandelt und auf die in Tab.1 beschriebenen Endkonzentrationen gebracht. Nach der Zentrifugation (100 000 g, 1 h) wurden die Überstände untersucht. Die optimale Triton-Konzentration richtete sich nach der vorgegebenen NaCl-Konzentration. Bei einer Endkonzentration von 0,6 M NaCl wurden 1,5 % Triton gebraucht, bei 0,2 M NaCl wurden 2,0 bis 2,5 % Triton gebraucht. In beiden Fällen wird etwa 40-50 % des Gesamtproteins mit geringfügigem Verlust an Komplex III vorextrahiert. Während jedoch bei der vorgegebenen NaCl-Konzentration von 0,6 M die Triton-Konzentration exakt auf 1,5 % einzustellen ist, besteht bei der Konzentration von 0,2 M NaCl eine gewisse

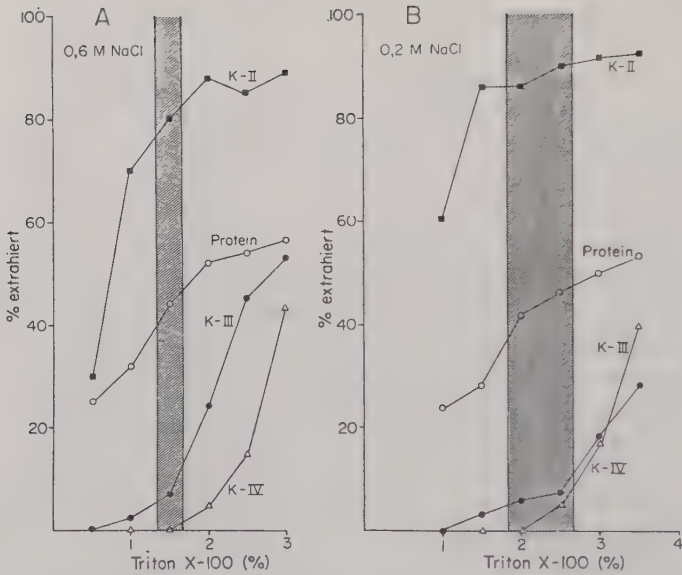


Abb.2 Negative Extraktion bei variabler Triton-Konzentration und einer NaCl-Konzentration von 0,6 M (A) bzw. 0,2 M (B). Die Protein-Konzentration lag sowohl für (A) als auch für (B) bei 20 mg/ml.

- K-II (Succinat-DCIP-Reduktase-Aktivität)
- K-III (560-575 nm ; Red.-Ox.-Differenzspektrum)
- △—△ K-IV (603-635 nm ; Red.-Ox.-Differenzspektrum)
- Protein (Lowry)

Die schraffierten Flächen zeigen den Bereich der optimalen Auflösung.

Freiheit bezüglich der einzustellenden Triton- bzw. Protein-Konzentration. Dies soll durch die Breite der Schraffierung in Abb.2 B angedeutet sein. Aus diesem Grund ist der Vorextraktion bei 0,2 M NaCl der Vorzug zu geben.

3.1.1.3. Extraktion durch Ammoniumsulfat oder Ultraschall

Eine Vorextraktion mit 40 mM Ammoniumsulfat (Tab.1) führt zu einem Ergebnis, das einer NaCl-Extraktion bei 1,5 % Triton und 0,6 M NaCl (vgl.Abb.2 A) entspricht. Die Präparation von Submitochondrialen Partikeln (SMP), die auch Ultraschallpartikel genannt werden, führt zu einer Anreicherung des K-II um den Faktor 2 bei einer Ausbeute von 50 %.

3.1.2. Solubilisierung des Komplex III

Nach der Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Anreicherung des K-III durch eine Negativextraktion (siehe Abb.2 B) soll nun der K-III selbst in Lösung gebracht werden.

3.1.2.1. Solubilisierung aus vorextrahierten Mitochondrien

Die Vorextraktion für die folgenden, in Tab.2 zusammengefaßten Solubilisierungsversuche wurde nach 3.1.1.2. bei konstanter NaCl-Konzentration von 0,2 M vorgenommen.

Die Auflösung bei einer Salzkonzentration von 1 M NaCl (Abb.3 A) führt zu einer Separation von K-III und K-IV. Bei Verwendung von 2 % Triton ist der K-III annähernd quantitativ solubilisiert, während vom K-IV nur 13 % im Überstand zu finden sind. Es ist eine Anreicherung des spezifischen Proteingehalts (Quotient aus Häm b-Konz. und Proteinkonz.) von $b/P = 0,9-1,0$ (nMol/mg) auf $b/P = 1,5-1,7$ (nMol/mg) erreichbar. Die auf den ersten Blick überzeugende Solubilisierungsmethode bringt gewisse Schwierigkeiten mit sich. Man muß berücksichtigen, daß bei einer sehr hohen Salz-

konzentration solubilisiert wurde (1 M), was die Gefahr einer Dissoziation des Multiproteinkomplexes in sich birgt.

Solubilisierung	Protein (mg/ml)	Triton- Optimum (%)	NaCl (M)	Sucrose (M)	Ammonium- sulfat (M)
(3.1.2.1.)					
aus vorextra-	16,2	1,5-2,0	1	-	-
hierten Mito-	15,3	2,5-3,0	0,5	-	-
chondrien	13,0	> 2,5	0,5	0,25	-
	15,0	5,5	-	-	0,2
(3.1.2.2.)					
aus Mito-	40,0	5	0,5	0,25	-
chondrien					

Tab.2 Zusammenstellung der Solubilisierungsversuche des K-III

Die Solubilisierungen bei einer Salzkonzentration von 0,5 M NaCl (Abb.3 B) bzw. mit 0,5 M NaCl plus 0,25 M Sucrose (Abb.3 C) führen weder zu einer befriedigenden Separation der Komplexe III und IV, noch zu einer wesentlichen spezifischen Anreicherung. Das b/P-Verhältnis wird von 0,9-1,0 nur zu 1,2-1,3 (nMol/mg) erhöht. Trotzdem sind diese Solubilisierungsmethoden von Interesse, da die Abtrennung des K-IV vom K-III auf der folgenden Hydroxyapatitsäule keine Schwierigkeiten bereitet. Es zeigte sich, daß der K-IV umso leichter vom Hydroxyapatit (HA) eluiert wird, je höher die Triton-Konzentration zur Solubilisierung war. Es wird angenommen, daß hohe Detergens-Konzentrationen die Lipidhülle des K-IV ablösen und damit zu einem veränderten Bindungsverhalten an HA führen.

Aus diesem Grund wurde üblicherweise (Präp.3, Tab.4) nicht 2,5 % Triton zur Solubilisierung in Gegenwart von 0,5 M NaCl und 0,25 M Sucrose verwendet, was zur annähernd quantitativen Solubilisierung des K-III ausgereicht hätte, sondern 5 % Triton .

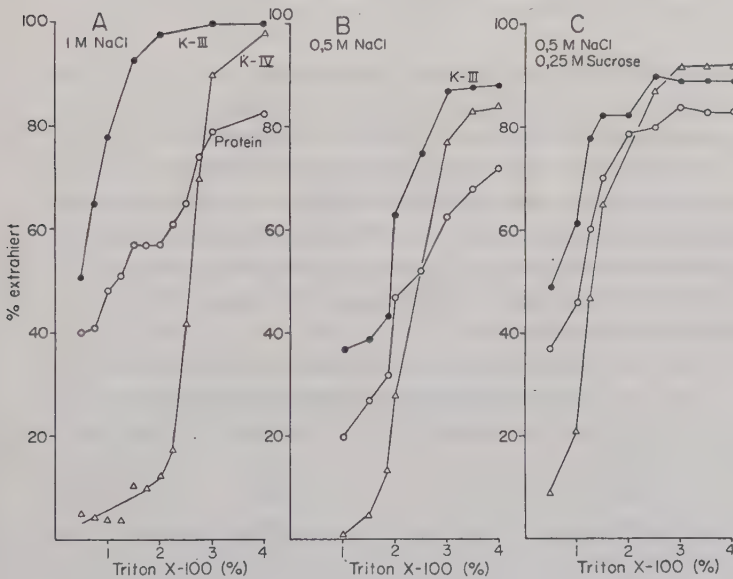


Abb.3

Solubilisierung des Komplex III aus vorextrahierten Mitochondrien bei einer NaCl-Konzentration von 1 M (A), bei einer NaCl-Konz. von 0,5 M (B) und einer NaCl-Konz. von 0,5 M plus 0,25 M Sucrose (C).

Zur Solubilisierung des K-III wurde auch Ammoniumsulfat (0,2 M) verwendet, wenn die Vorextraktion bereits mit Ammoniumsulfat vorgenommen worden war. Die Protein-Konzentration war 15 mg/ ml, die Triton-Konzentration lag bei 5,5 %. Bei dieser Art der Solubilisierung wurde nur auf die quantitative Extraktion des K-III Wert gelegt. Das hatte zur Folge, daß auch der K-IV quantitativ extrahiert wurde. Der b/P-Quotient lag bei 1 (nMol/mg).

3.1.2.2. Solubilisierung aus Mitochondrien

Wenn neben Komplex III auch Komplex II isoliert werden sollte, mußte von nicht vorextrahierten Mitochondrien ausgegangen werden. Die aufgetauten Mitochondrien wurden 10 Min. bei 25 000 g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Sediment wurde mit dem gleichen Volumen der Stammlösung I versetzt und anschließend homogenisiert.

	Stammlösung I	Stammlösung II
Triton (%)	10	5
NaCl (M)	1	0,5
Mops pH 7,2(mM)	20	20
NaN ₃ (mM)	1	1
Sucrose (M)	0,5	0,25

Die Proteinkonzentration wurde durch Verdünnung mit der Stammlösung II auf 40 mg/ml erniedrigt. Die Endkonzentrationen waren somit identisch mit den für Stammlösung II angegebenen Konzentrationen. Obwohl der K-III zu 85-100 % in Lösung ging und gleichzeitig nur 5-10 % des K-IV solubilisiert wurden, war nur eine geringe spezifische Anreicherung des K-III zu

erreichen. Der b/P-Quotient lag bei 0,6-0,7. Trotzdem hat diese Variante der Solubilisierung einen für die Präparation des K-II entscheidenden Vorteil. Der K-II bindet bei den vorgegebenen Konzentrationen nicht mehr an HA, während die Bindung der meisten anderen Proteine an HA noch möglich ist.

3.2. Isolierung des Komplex III durch eine neue Methode und seine weitere Charakterisierung

Es wurden verschiedene Varianten der K-III-Präparation erarbeitet, die sich sowohl in Vorextraktion und Solubilisierung als auch in den Elutionsbedingungen auf der HA-Säule unterscheiden. Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationen betreffen in erster Linie die Ausbeute und die Reproduzierbarkeit, während die Reinheit und die Eigenschaften der einzelnen Präparate nur geringfügig variieren. Aus diesem Grund wird nur die am intensivsten untersuchte Präparation 2 der Tab.4 im Detail beschrieben. Die Beschreibung der anderen Verfahren, auch die der optimierten Methode 3 beschränkt sich auf die Darstellung in Tab.4.

3.2.1. Isolationsgang

Die neue Methode zur Isolierung des Komplex III zeichnet sich durch ihre präparative Einfachheit aus. Nach Vorextraktion und Solubilisierung führt eine einzige Chromatographie an Hydroxyapatit zum reinen Komplex III.

Bindung von Ant. an Mitochondrien



Vorextraktion u. Solubilisierung



Chromatographie an HA

- 1) Triton : 0,5 %
 NaCl : 250 mM
 NaN₃ : 1 mM
 NaPi : 85 mM
 (pH 7,2)
- 2) Triton : 0,05 %
 NaCl : 50 mM
 NaN₃ : 1 mM
 NaPi : 35 mM
 (pH 7,2)
- 3) Triton : 0,05 %
 NaN₃ : 1 mM
 NaPi : 150 mM
 (pH 7,2)

Abb.4 Schematische Darstellung der Komplex III-Präparation mit den bei der Chromatographie an HA angewandten Elutionspuffern.

3.2.1.1. Antimycin-Bindung zur Stabilisierung der Proteinstruktur

Nach dem Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Mitochondrien wurde mit 20 mM Mops pH 7,2 auf etwa 15 mg Protein pro ml verdünnt. Es wurden 2 nMol Antimycin (Ant.) pro mg Protein zugegeben, was bei dem b/P-Verhältnis der Mitochondrien von 0,5 (nMol/mg) einem vierfachen Überschuß über sämtliche Ant.-Bindungsstellen am K-III entspricht. Voraussetzung für diese Berechnung war die Annahme, daß nur 1 Mol Ant. pro Mol K-III bindet (siehe 3.2.2.4.). Nach 10 Min. Inkubationszeit im Eisbad wurde nach 3.1.1.3. mit Ammoniumsulfat vorextrahiert. Die anschließende

Solubilisierung wurde nach 3.1.2.1. ebenfalls mit Ammoniumsulfat durchgeführt (s.Tab.2)

3.2.1.2. Chromatographie an Hydroxyapatit

Die Säule (30 x 1,5 cm) wurde mit 50 ml HA gefüllt, das nach Suspendierung in 10 mM NaPi pH 6,8 im Wasserstrahlvakuum entgast wurde. Zur Äquilibrierung der Säule wurden zwei Säulenvolumina des Elutionspuffers 1 verwendet . Die Bedingungen bei Auftragung und Elution, sowie Volumen und Wirkung der einzelnen Elutionspuffer sind in Tab.4 zusammengefaßt. Die Fließgeschwindigkeit der Säule beträgt 25-40 ml/h. Sie wird entweder über eine peristaltische Pumpe oder über den von den Elutionspuffern ausgeübten hydrostatischen Druck reguliert.

Wie in Abb.5 zu sehen ist, eluiert ein Großteil des aufgetragenen Proteins bereits ehe der Elutionspuffer 1 zur Wirkung kommt. Die Hauptkomponente dieses Durchlaufs ist der Adeninnukleotid-Carrier . Daneben ist auch der Anteil des Komplex II wiederzufinden, der durch die Vorextraktion nicht entfernt werden konnte. Die im Eluat gemessenen Triton-Konzentrationen entsprechen den Triton-Konzentrationen der aufgetragenen Puffer. Nur bei der sehr niedrigen Triton-Konzentration von 0,05 % in Puffer 3, der den K-III eluiert, ist der Anteil des am Protein gebundenen Triton erkennbar.

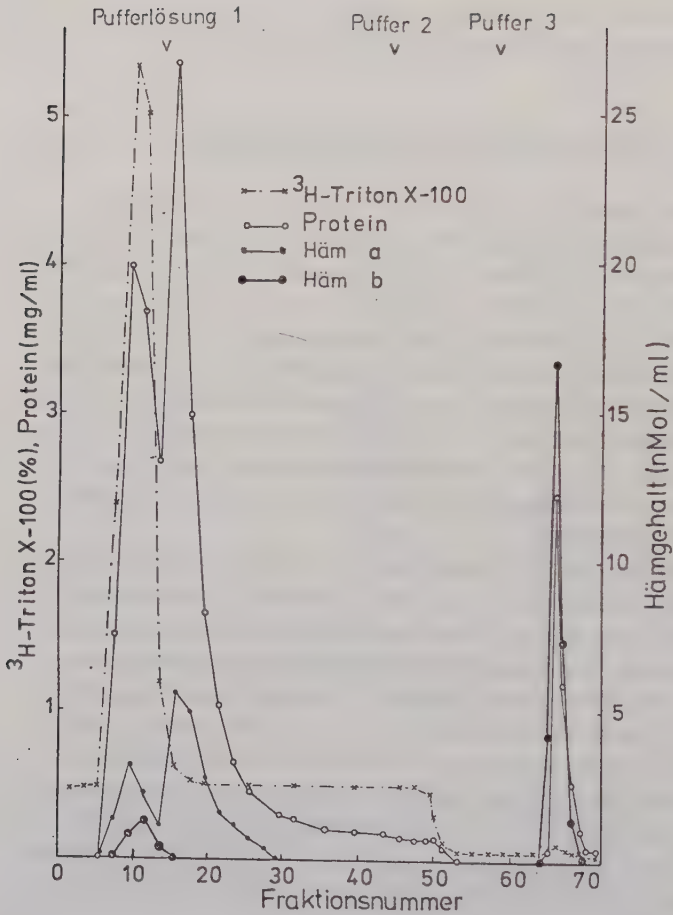


Abb.5 Elutionsprofil der Chromatographie an Hydroxyapatit
Die Triton-Konzentration wurde über die spezifische Radioaktivität des verwendeten ^3H -Triton X-100 bestimmt. Puffer 3 eluiert den elektrophoretisch reinen Komplex III in konzentrierter Lösung.

Wie aus Tab.3 ersichtlich ist erfolgte bis zur Auf-
tragung auf die HA-Säule nur eine Anreicherung des
Komplex III um den Faktor 2 . Die Abtrennung von ca.
40 % des Gesamtproteins vor der Chromatographie an
HA ist jedoch sinnvoll, da dadurch die Kapazität des
Hydroxyapatit besser genutzt wird. Die Chromatogra-
phie selbst bringt eine Anreicherung um den Faktor
10. Die Ausbeute des Chromatographie-Schrittes von
60 % ist befriedigend.

Fraktion	Protein (mg)	Häm b_{III} (nMol)	b_{III}/P (nMol/mg)	Anreich- erung (fach)	Ausbeute (%)
Mitochondrien	980	390	0,4	1	100
vorextrahierte Mitochondrien	530	370	0,7	1,7	95
HA-Auftrag	440	350	0,8	2	90
HA-Eluat	25	215	8,6	21	55

Tab.3 Anreicherung und Ausbeute des Komplex III bei den ein-
zelnen Präparationsstufen.

b_{III}/P : Quotient aus der dem Cytochrom b_{III} zuzu-
ordnenden Häm-Konzentration (nMol/ml) und
der Proteinkonzentration (mg/ml).

3.2.1.3. Vergleich der verschiedenen präparativen Varianten der Komplex III-Isolierung

In keiner der in Tab.4 dargestellten Varianten der K-III-Isolierung ist eine Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität vorhanden, was auf das Fehlen der Phospholipide, des Eisen-Schwefel-Proteins (FeS-Protein) und auf den gebundenen Hemmstoff Antimycin zurückzuführen ist. Um diese Unterschiede gegenüber anderen K-III-Präparationen zu berücksichtigen, soll diese Präparation mit K-III' bezeichnet werden.

Der Nachteil der chronologisch ersten Präparation (Präp.1) liegt in den hohen Proteinverlusten bei der SMP-Präparation. Außerdem ist die Verwendung von 110 mM Phosphat im Elutionspuffer 1 aus folgenden Gründen ungünstig :

- 1) Die Reproduzierbarkeit ist stark abhängig von den Bindungseigenschaften des verwendeten HA, denn 110 mM NaPi, 90 mM NaCl sind Grenzkonzentrationen, die selbst bei gut bindendem HA den K-III' bereits langsam eluieren.
- 2) Es dürfen nur geringe Proteinmengen aufgetragen werden, was sich sowohl auf die Ausbeute als auch auf die Reinheit der Präparation negativ auswirkt.

Die Präp.2 führt zwar zu einem elektrophoretisch reinen und bei 4°C über Wochen stabilen K-III' mit 55 % Ausbeute, wurde aber von der Routinemethode 3 mit einer Ausbeute von 70 % abgelöst. Der Zusatz von 50 mM NaPi bei der Beladung der Säule in Präp.3 verhindert die Bindung sehr vieler Proteine, die ohne Zusatz von Phosphat mit dem K-III' um die Bindungsstellen am Säulenmaterial konkurrieren würden.

	Präp.1	Präp.2	Präp.3	Präp.4
<u>Mitochondrien</u>				
Protein (mg)	1480	980	1900	1000
Häm b _{III} (nMol)	590	390	760	400
K-III ^{III} (%)	100	100	100	100
b _{III} /P (nMol/mg)	0,4	0,4	0,4	0,4
<u>nach</u>				
<u>Vorextraktion</u>	3.1.1.3.	3.1.1.3.	3.1.1.2.	-
Vorextraktion	SMP-Präp.	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 M NaCl	
Protein (mg)	295	530	800	
Häm b _{III} (nMol)	295	370	720	
K-III ^{III} (%)	50	95	95	
b _{III} /P (nMol/mg)	1,0	0,7	0,9	
<u>nach</u>				
<u>Solubilisierung</u>	3.1.2.1.	3.1.2.1.	3.1.2.1	3.1.2.2.
Solubilisierung	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NaCl,Sucr.)	(NaCl,Sucr.)
Protein (mg)	180	440	800	490
Häm b _{III} (nMol)	250	350	720	340
K-III ^{III} (%)	42	90	95	85
b _{III} /P (nMol/mg)	1,4	0,8	0,9	0,7
<u>Beladung der</u>				
<u>HA-Säule</u>				
Protein (mg)	180	440	800	490
Protein (mg/ml)	14	11	14	25
Prot./HA (mg/ml)	4,4	11	20	10
Häm b _{III} (nMol)	250	350	720	340
Zugabe von NaPi	-	-	+50 mM NaPi	-
<u>K-III^{III}-Eluat</u>				
Protein (mg)	18	25	62	29
Häm b _{III} (nMol)	150	215	530	200
K-III ^{III} (%)	25	55	70	50
b _{III} /P (nMol/mg)	8	8,6	8,6	7
Anreich.(fach)	20	21	21	18

Tab.4 Übersicht über die präparativen Varianten der K-III^{III}-Präparation. Die Präparationsansätze sind für jeweils 50 ml HA berechnet. Mit Ausnahme von Präp.4 werden mit Ant. vorinkubierte Mitochondrien verwendet. Bei Präp.4 wird das Ant. erst mit dem Elutionspuffer 2 zugegeben.

	Präp.1	Präp.2	Präp.3	Präp.4
Elutionspuffer 1				
Triton (%)	0,5	0,5	0,5	-
NaCl (mM)	90	250	250	200
Mops (mM)	-	-	-	10
NaN ₃ (mM)	1	1	1	1
NaPi (mM)	110	85	85	-
pH 7,2				
Volumen (SV)	1-2	3-5	2	1
Wirkung	Elution von ≥ 50 % des aufgetragenen Proteins			Bindung aller Proteine an HA (Ausnahme:K-II, AdN-Carrier und wenige and.Prot.)
Elutionspuffer 2				
Triton (%)	0,05	0,05	0,05	2
NaCl (mM)	-	50	50	250
Mops (mM)	-	50	-	-
NaN ₃ (mM)	1	1	1	1
NaPi (mM)	10	-	35	85
pH 7,2				+2 nMol Ant./ nMol Häm b _{III}
Volumen (SV)	0,5	0,5	0,5	0,2
Wirkung	Erniedrigung von Salz-und Detergens-Konzentration			Auflösung von Proteinaggregaten
Elutionspuffer 3				
Triton (%)	0,05	0,05	0,05	wie Puffer 1
NaN ₃ (mM)	1	1	1	der Präp.2
Na-Citrat(mM)	8	-	-	
NaPi (mM)	10	150	150	
pH 7,2				
Volumen (SV)	3	1	1	
Wirkung	Elution des Komplex III'			Elution von $\geq 50\%$ des aufgetrag.Prot. (zus.mit Puffer 2)
Elutionspuffer 4 u.5				
	-	-	-	wie Puffer 2 u.3 der Präp.3

Tab.4 ff Übersicht über die präparativen Varianten der K-III-Präp.

Die Präparationsmethode 4 ermöglicht die Isolierung der Komplexe II und III' aus dem gleichen Ansatz. Der Elutionspuffer 1 kann selbst keine Proteine eluieren. Der Komplex II, der Adeninnukleotid-Carrier und einige nicht identifizierte Proteine passieren jedoch im Auftragsmedium ungebunden die HA-Säule. Nachdem zur Schonung des Triton-empfindlichen Cyt.b_{II} auf einen Triton-Zusatz zum Puffer 1 verzichtet wird kommt es zu Proteinaggregationen auf der HA-Säule. Um diese Aggregate wieder aufzulösen wird im Elutionspuffer 2 Triton in Höhe von 2 % verwendet. Gleichzeitig wird dem Puffer 2 Antimycin zum Schutz des bis dahin nicht durch Ant. stabilisierten K-III' zugesetzt. Anschließend kommen die Elutionspuffer 1 bis 3 der Präp.3 zur Anwendung. Mit dieser Methode ist nur ein b_{III}/P-Verhältnis von 7 (nMol/mg) erreichbar im Vergleich zu 8,6 (nMol/mg) bei Präp.2 und 3 . Dieser K-III' ist dennoch zur Präparation der Proteinuntereinheiten, speziell von elektrophoretisch reinem Cyt.b_{III} verwendbar. Die Verunreinigungen binden zusammen mit dem Cyt.c₁ bei der Spaltung mit Guanidin auf HA, während das Cyt.b_{III} die HA-Säule ungebunden passiert (s.3.3.1.).

3.2.2. Charakterisierung des Komplex III'

Vor der Entwicklung der hier beschriebenen K-III'-Präparationsmethode durch Chromatographie an HA mit Triton als Detergens, gab es nur Präparationsmethoden, die nach dem gleichen Trennprinzip arbeiteten, nämlich einer Ammoniumsulfat- bzw. Ammoniumacetatfällung aus einer Cholat- bzw. Desoxycholat-Lösung (45,47, 103-105). Es war von großem Interesse, mittels einer nach anderen Trennprinzipien arbeitenden Präparationsmethode festzustellen, ob ein Komplex III, bestehend aus der gleichen Anzahl von Untereinheiten mit gleichen Charakteristika isoliert wird. Dies wäre ein starker Hinweis für die Existenz dieses Multiproteinkomplexes in der mitochondrialen Atmungskette.

3.2.2.1. Polypeptid- und Aminosäurezusammensetzung

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt eine Unterscheidung zwischen 8 in ihrem Molekulargewicht unterschiedlichen Proteinen (Abb.6). Zwei Proteine mit Molekulargewichten von 49 000 und 47 000 werden als Core-Proteine 1 und 2 bezeichnet. Dem Cytochrom b_{III} ist ein Molekulargewicht von 31 000 zuzuordnen. Das Cytochrom c_1 ist als Flanke der Cytochrom b_{III} -Bande mit einem Molekulargewicht von 33 000 zu sehen. Weiteren Proteinbanden sind die Molekulargewichte 12 000, 11 000, 9 000 und 4 000 zuzuordnen. Die Proteine mit den Molekulargewichten 49 000 und 47 000 tragen keine prosthetischen Gruppen. Ihre Funktion ist noch völlig unbekannt. Die Bande des Cyt.b ist kleiner als erwartet. Die Erklärung dafür ist in einem niedrigen Färbeindex zu suchen (47).

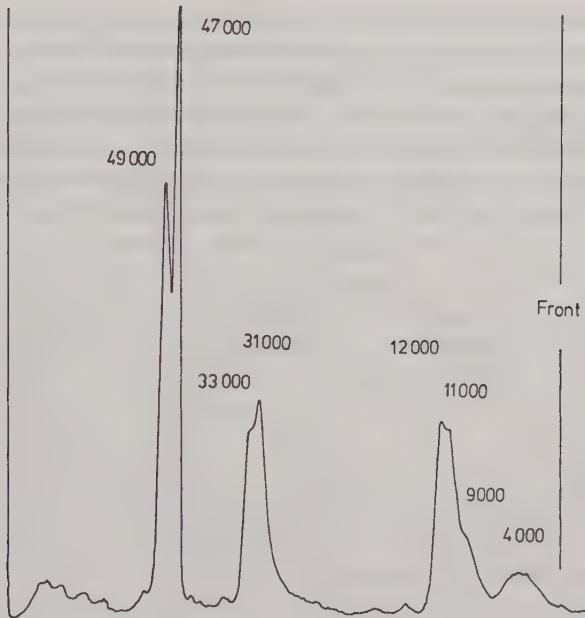


Abb. 6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Komplex III' (Neville und Glossmann : 17 / 0,75) Densitometrische Messung bei 546 nm nach Anfärbung mit Coomassie-Blue-G-250.

Neben der Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen und von säurelabilem Schwefel führt auch die SDS-PAGE zu dem Ergebnis, daß das FeS-Protein in dieser K-III'-Präparation fehlt, da die zu erwartende Proteinbande bei 25 000 D fehlt. Die kleinen Polypeptide tragen eben-

falls keine prosthetische Gruppe. Das molekulare Verhältnis der Redox-Komponenten Cyt.b_{III} und Cyt.c₁ kann über die Messung der Pyridinhämochromogene bestimmt werden, wenn die Stöchiometrie Häm/Protein bekannt ist. Da nach 3.3.2. eine Stöchiometrie von zwei Häm-Gruppen pro Molekül Cyt.b_{III} bestimmt wurde, was der üblicherweise angenommenen 1:1-Stöchiometrie widerspricht, muß hier ein molekulares Verhältnis von 1 Mol Cyt.b_{III} pro Mol Cyt.c₁ gefordert werden.

Komponente	Gehalt (nMol/mg)	Molekulares Verhältnis
Häm b _{III}	8,6	2
Häm c ₁	4,1	0,95
FeS-Protein	0	0
Ubichinon	0	0

Tab.5 Analyse der Redoxkomponenten des K-III'

Der Verlust des FeS-Proteins ist im Zusammenhang mit dem Fehlen von Phospholipiden zu sehen. Vermutlich wird die Ablösung des FeS-Proteins vom K-III durch das Detergens-bedingte Abstreifen des Phospholipid-mantels erleichtert. Mit den Phospholipiden wurde auch das Ubichinon quantitativ vom Komplex abgetrennt. Unter den gegebenen Bedingungen konnte also kein Protein-gebundenes Ubichinon festgestellt werden, was jedoch die Existenz eines Ubichinon-bindenden Proteins nicht ausschließt. Die SDS-PAGE bestätigt die Zusammensetzung des Komplex III aus mindestens 9 Proteinuntereinheiten, wenn das hier fehlende FeS-Protein dazugezählt wird.

Die Aminosäureanalyse des K-III' wurde zur Bestimmung der Polarität und des partiellen spezifischen Volumens durchgeführt. Die Polarität ist mit 45 % für ein Membranprotein sehr hoch, was mit der relativ niedrigen Detergensbindung (siehe 3.2.2.2.) in Einklang steht. Das aus der Aminosäureanalyse berechnete partielle spezifische Volumen beträgt 0,737 (ml/g).

Aminosäure	Mol-%	Zahl der Aminosäuren
<u>Unpolar</u>		
Alanin	9,50	171
Valin	5,32	96
Leucin	9,93	179
Isoleucin	3,65	66
Prolin	8,52	153
Methionin	1,47	27
Phenylalanin	4,10	74
Tryptophan	1,00	18
Glycin	6,90	124
Cystein	0,71	13
Tyrosin	3,77	68
<u>Polar</u>		
Aspartat	8,40	151
Glutamat	10,23	184
Lysin	6,85	123
Arginin	5,17	93
Histidin	2,87	52
Serin	6,26	113
Threonin	5,36	97

Tab.6 Aminosäureanalyse des Komplex III'

Die Aufteilung der Aminosäuren in eine polare- und eine unpolare Gruppe erfolgte nach Capaldi und Vanderkooi (87).

3.2.2.2. Hydrodynamische Eigenschaften

Die Bestimmung des Molekulargewichtes des gesamten Komplexes, sowie die Bestimmung seines Aggregationszustandes erfolgte mit der analytischen Ultrazentrifuge. Zur Berechnung des Molekulargewichtes ist die Kenntnis des gebundenen Triton erforderlichlich.

Die Tritonbindung am Komplex III' wurde auf zweierlei Weise bestimmt. Das am isolierten K-III' gebundene kalte Triton wurde entweder nach beendeter Präparation gegen ^3H -Triton ausgetauscht oder die Isolierung des K-III' erfolgte bereits in ^3H -Triton.

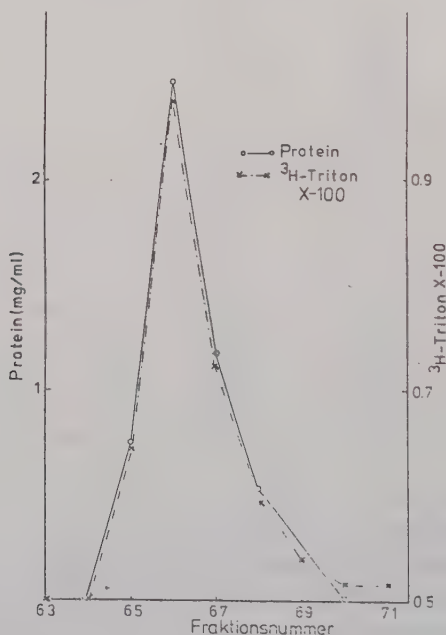


Abb.7 K-III'-Elutionsprofil der Chromatographie an HA zur Bestimmung der Triton-Bindung am K-III'.

(Ausschnitt der Abb.5 in vergrößertem Maßstab)

Das Elutionsprofil in Abb.5 zeigt den Verlauf einer Präparation mit ^3H -Triton im kleinsten Maßstab (4 ml Hydroxyapatit), die sich abgesehen von der Dimension nicht von einer Präparation mit 100-fach größerem Ansatz unterscheidet. Die Abb.7 zeigt einen Ausschnitt desselben Elutionsprofils in verändertem Maßstab, wobei nur die Protein- und die Detergens-Konzentrationen aufgetragen sind. Das konstante Verhältnis von gebundenem Triton zum Protein des K-III' ist offensichtlich. Die daraus berechnete Triton-Bindung beträgt 0,2 g Triton / g Protein.

Für die Experimente mit Austausch des Triton gegen ^3H -Triton wurden jeweils 4 mg des gereinigten K-III' auf kleine HA-Säulen (2 ml) gebunden. Der gebundene Komplex wurde mit 0,05 % ^3H -Triton, 50 mM Mops, 50 mM NaCl und 1 mM NaN_3 (pH 7,2) in einem zyklisierenden Puffersystem äquilibriert. Nach Äquilibrierungszeiten von 5,5 bzw. 7,5 oder 16 Stunden wurde im Äquilibrierungspuffer Na-Citrat zu einer Konzentration von 12 mM gelöst und das zyklisierende Puffersystem geöffnet. Als Ergebnis wurde wieder eine Triton-Bindung von 0,2 g/g Protein gefunden und zwar unabhängig von der Äquilibrierungszeit. Der vollständige Triton-Austausch erfolgt also in weniger als 5,5 Stunden.

Mit der analytischen Ultrazentrifuge wurden Sedimentations-Geschwindigkeits- und Sedimentations-Gleichgewichtsläufe durchgeführt. Es wurde geprüft, ob das Häm des Komplexes (Absorption bei 415 nm) und das Protein (Absorption bei 280 nm) das gleiche Sedimentationsverhalten zeigen. Beide Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe ergaben bei der Auftragung des Logarithmus des Proteinabstandes vom Rotationszentrum gegen die Zeit Geraden mit annähernd gleicher Steigung. Der Sedimentationskoeffizient wurde nach Schachmann und Edelstein (98,99) zu $s_{20,w} = 13,0 - 13,1 \text{ S}$ berechnet.

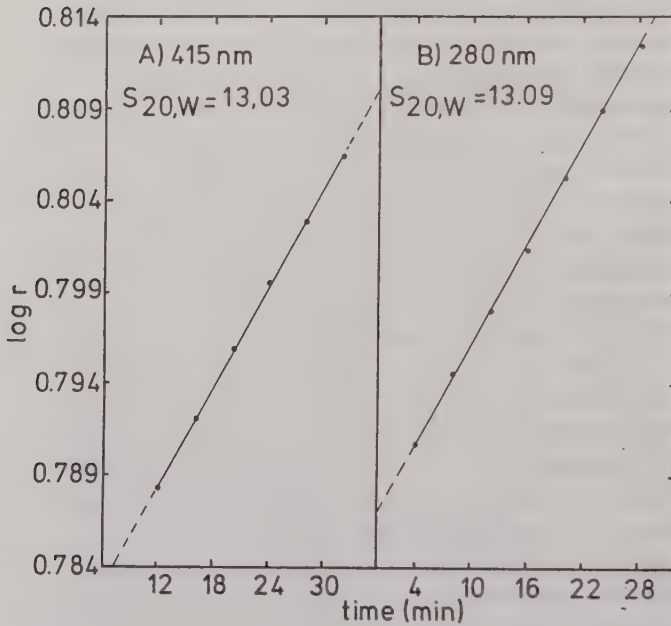


Abb.8 Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe des Komplex III' bei einer Umdrehungszahl von 48 000 UpM und einer Protein-Konzentration von 0,5 mg/ml.

Die Sedimentation wurde in A) über das Häm-Signal bei 415 nm im oxidierten Zustand und in B) bei 280 nm verfolgt. Bei 280 nm überlagern sich die Absorptionen der aromatischen Aminosäuren des Proteins und die Absorption des Protein-gebundenen Triton. Temperatur : 22 °C

Pufferkonzentrationen in A) : 0,05 % Triton, 20 mM Mops
pH 7,5

in B) : 0,025 % Triton, 20 mM Mops
pH 7,5

Die Kurven der Sedimentations-Gleichgewichtsläufe zeigen ebenfalls bei den beiden Wellenlängen weitgehende Übereinstimmung.

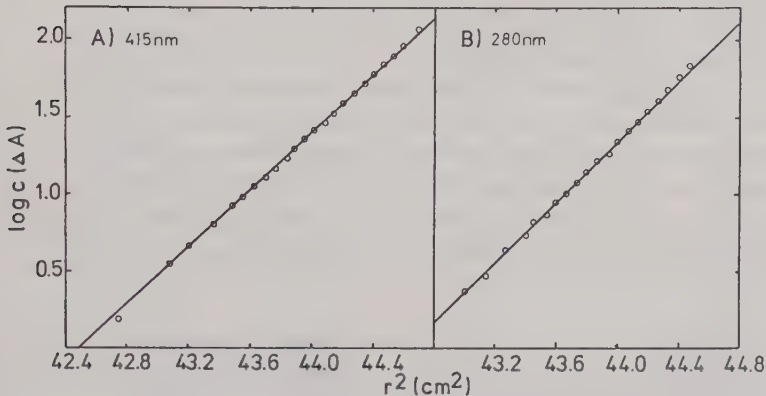


Abb.9 Sedimentations-Gleichgewichtsläufe des Komplex III'

Die Absorption wurde in A) bei 415 nm, in B) bei 280 nm verfolgt. Die Pufferkonzentrationen für A) und B) sind identisch mit den in der Legende zu Abb.8 beschriebenen. Der Logarithmus der Schreiberauslenkung in mm (prop.zur Änderung der Absorption) ist gegen das Quadrat des Abstandes (cm^2) vom Zentrum der Rotation aufgetragen. Umdrehungszahl : 9 000 UpM ; Proteinkonz.: 0,2 mg/ml Temperatur : 22,3 ° C ; Nach 20 Stunden war der Gleichgewichtszustand erreicht.

Die Analyse der Kurve A) ergibt nach Korrektur für das gebundene Triton nach Tanford (96) ein Molekulargewicht von 400 000, die der Kurve B) ein MG von 440 000. Die Linearität dieser Kurven beweist die Homogenität

der Präparation und zeigt damit das Vorliegen eines einzigen Häm-tragenden Multiproteinkomplexes. Das aus dem Cyt.c₁-Gehalt berechnete minimale Molekulargewicht beträgt 233 000 . Aus diesem Grund wird gefolgert, daß die K-III'-Präparation in Triton in einem dimeren Aggregationszustand vorliegt.

Die Stokes-Radien des Komplex III', sowie seiner Cyt.b- und Cyt.c₁-Untereinheiten, die später behandelt werden sollen, wurden mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt. Diese Methode erlaubt eine Abschätzung der Stokes-Radien und damit der Diffusionskoeffizienten der Detergens-Protein-Einheit. Als Eichproteine wurden die folgenden wasserlöslichen, nicht Triton-bindenden Proteine verwendet.

Nr.	Eichprotein	Stokes- Radius (nm)	Lit.stelle
1	Phosphorylase A aus Kaninchenmuskel	6,3	106
2	Ferritin aus Pferd milz	6,0	107
3	Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel	5,5	108
4	Katalase aus Rinderleber	5,2	109
5	Aldolase aus Kaninchenmuskel	4,6	110
6	Hexokinase aus Hefe	4,1	111
7	Chymotrypsinogen A aus Rinderpankreas	2,2	93

Tab.7 Eichproteine zur Bestimmung von Stokes-Radien durch Gelfiltration

Der Stokes-Radius des K-III' beträgt 6,65 nm. Zum Vergleich sollen hier auch schon die Daten weiterer untersuchter Präparationen aufgeführt werden.

Komplex III'	: 6,65 nm
Cyt.b _{III}	: 5,65 nm
Cyt.c ₁	: 5,90 nm
Komplex IV	: 6,35 nm
Triton X-100-Micelle	: 4,70 nm

Tab.8 Zusammenfassung der Stokes-Radien der nach neuen Präp.-methoden isolierten Proteine

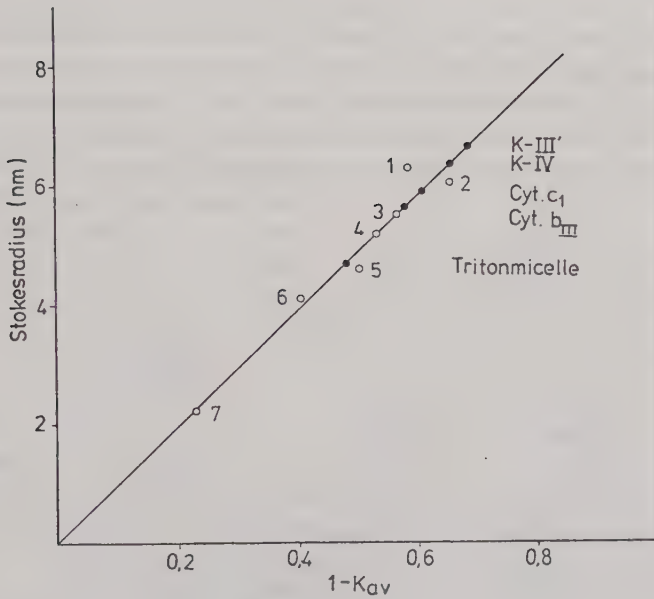


Abb.10 Bestimmung von Stokes-Radien durch Gelfiltration an Sepharose 6B-C1 (siehe analytische Methoden). Die offenen Kreise stehen für die in Tab.7 aufgeführten Eichproteine; die Punkte stehen für die untersuchten Präparationen, deren Stokesradien in Tab.8 zusammengefaßt sind. Die Elution der Proteine wurde anhand von Proteinbestimmungen nach Lowry oder anhand charakteristischer Lichtabsorptionen verfolgt.

3.2.2.3. Spektrale- und potentiometrische Eigenschaften

Abb.11 zeigt die Absolutspektren des K-III' mit den folgenden Maxima:

Kurve (A), oxidierten Zustand : 415 nm (γ -Bereich)

Kurve (B), reduzierten Zustand : 430 nm (Schulter bei 420 nm)

530 u. 524 nm (β -Bereich)

563 nm (Schulter bei

553 nm) (α -Bereich)

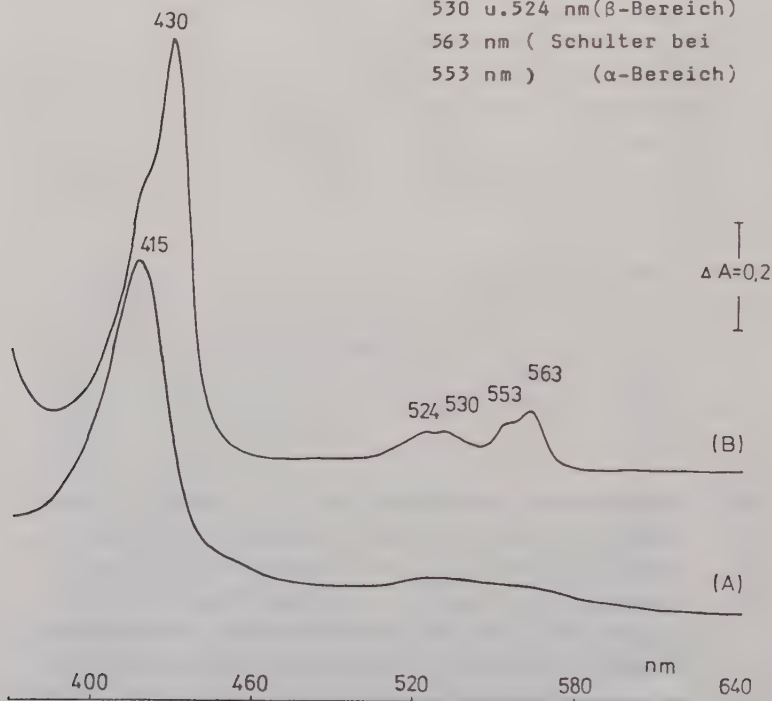


Abb.11 Absolutspektren des K-III' im oxidierten Zustand (A) und im reduzierten Zustand (B) bei Raumtemperatur. Die Reduktion erfolgte mit Dithionit. Es wurde gegen den K-III'-Elutionspuffer (0,05 % Triton, 150 mM NaPi pH 7,2) in der Referenzküvette gemessen.

Obwohl die Extinktionskoeffizienten im γ -Bereich um eine Größenordnung höher liegen als die im α -Bereich, wurde für die Messung der Cytochrom-Konzentrationen in Lösungen mit mehreren Cytochrom-Komponenten nur die Absorption im α -Bereich herangezogen, weil hier eine bessere Differenzierung der verschiedenen Cytochrome möglich ist.

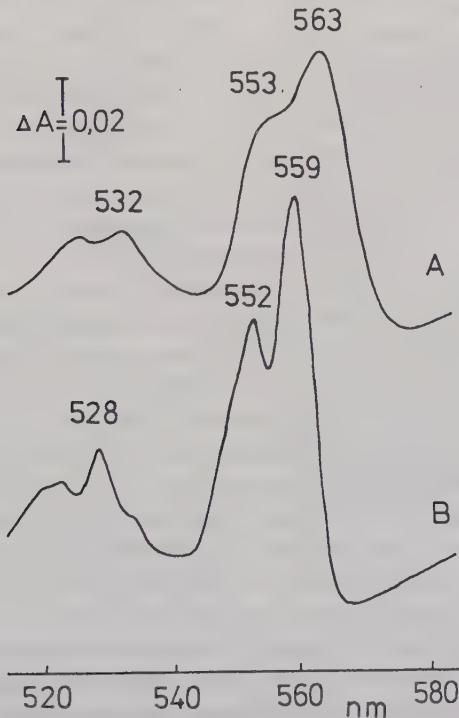


Abb.12 Differenzabsorptionsspektren des K-III' bei 25 °C (A) und bei -196 °C (B). Die Cytochrome waren in der Meßküvette mit Dith. reduziert, während sie in der Referenzküvette oxidiert vorlagen. Proteinkonz.: 0,6 mg/ml
Puffer : 0,5 M Sucrose, 0,05 % Triton, 150 mM NaPi pH 7,2
Schichtdicke in (A) : 5 mm , in (B) : 1 mm

Das Red.-Ox.-Differenzspektrum bei Raumtemperatur (Abb.12 A) weist ein Maximum bei 563 nm auf, das auf die Absorption des Cyt.b_{III} zurückzuführen ist und eine Schulter bei 553 nm, die dem Cyt.c₁ zuzuordnen ist. Der mit der Pyridinhämochromogenmethode bestimmte Extinktionskoeffizient des Cyt.b_{III} (integriert im K-III') ist $\epsilon_{563-575 \text{ nm}}^{\text{Dith.-Fecy}} = 28,5 \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{)}$, wenn eine Häm/Cyt.b-Stöchiometrie von 1:1 angenommen wird, bzw. $\epsilon_{563-575 \text{ nm}}^{\text{Dith.-Fecy}} = 57 \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{)}$, wenn nach 3.3.2. eine 2:1-Stöchiometrie angenommen wird. Eine bessere Auflösung der Cytochrome b_{III} und c₁ erhält man bei tiefen Temperaturen (Abb.12 B). Hier hat das Cyt.b_{III} ein Maximum bei 559 nm und Cyt.c₁ ein Maximum bei 552 nm. Wie in den folgenden Spektren gezeigt werden soll, können die Häm-Zentren des Cyt.b mit Hilfe von Elektrendonatoren, die ein geeignetes Redoxpotential einstellen, einzeln dargestellt werden (Abb.13). Cyt.c₁ kann durch Ascorbat einzeln dargestellt werden. Es hat eine symmetrische Absorptionsbande mit einem Maximum bei 553 nm (Abb.13 A). Im Differenzspektrum (TMPD / Ascorbat gegen Ascorbat) kann ein Häm-Zentrum des Cyt.b_{III} einzeln dargestellt werden (Abb.13 B). Da bisher von der Annahme ausgegangen worden war, daß sich das Cyt.b_{III} aus zwei b-Typ-Cytochromen (Cyt.b_K und Cyt.b_T) zusammensetzt, wurde diese Absorption dem Cyt.b_K zugeordnet. Das Maximum der symmetrischen Absorptionsbande liegt bei 562 nm. Schließlich kann auch das zweite Häm-Zentrum einzeln dargestellt werden, wenn in der Meßküvette mit Dithionit, in der Referenzküvette mit Ascorbat / TMPD reduziert wird (Abb.13 C). Die Absorptionsbande hat ein Maximum bei 564 nm und eine Schulter an der Flanke zu kürzerer Wellenlänge. In Analogie zu Cytochrom b_K und b_T sollen die beiden Häm-Zentren des Cyt.b_{III} nun als Häm-Zentren b_K und b_T bezeichnet werden.

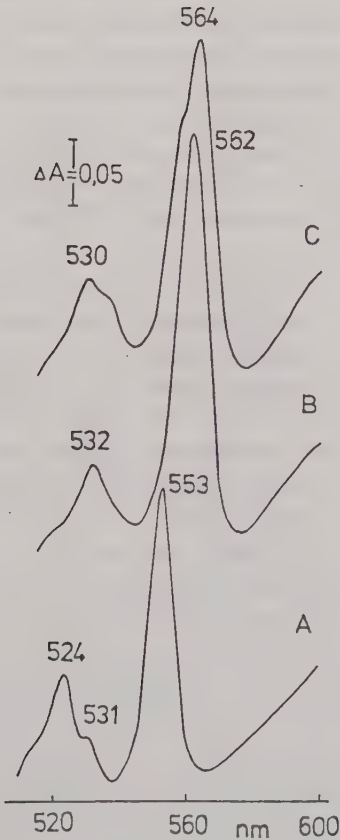


Abb.13

Differenzabsorptionsspektren des im K-III' integrierten Cytochrom c_1 und der Häm-Zentren b_K und b_T des Cytochrom b_{III}

A) Spektrum des Cyt. c_1

B) Häm-Zentrum b_K

C) Häm-Zentrum b_T

Cyt. c_1 wurde durch Zugabe von Ascorbat (5 mM) reduziert. Das Häm-Zentrum b_K wurde dargestellt durch das Differenzspektrum :

Ascorbat (5 mM) + TMPD (50 μ M) gegen Ascorbat (5 mM)

Das Häm-Zentrum b_T wurde dargestellt durch das Differenzspektrum :

Dith. gegen Ascorbat + TMPD

Proteinkonzentration: 0,3 mg/ml

Schichtdicke : 1 cm

Tieftemperaturspektren bei -196°C erlauben eine noch deutlichere Unterscheidung zwischen den beiden Häm-Zentren des Cyt. b_{III} (Abb.14). In diesem Fall hat das Häm-Zentrum b_K im Ascorbat / TMPD gegen Ascorbat-Spektrum eine symmetrische Absorptionsbande mit einem Maximum bei 559 nm (Abb.14 A), während das Dithionit gegen Ascorbat / TMPD-Differenzspektrum, das das Häm-Zentrum b_T einzeln darstellt, zwei Maxima bei 561 und 563 nm aufweist (Abb.14 B).

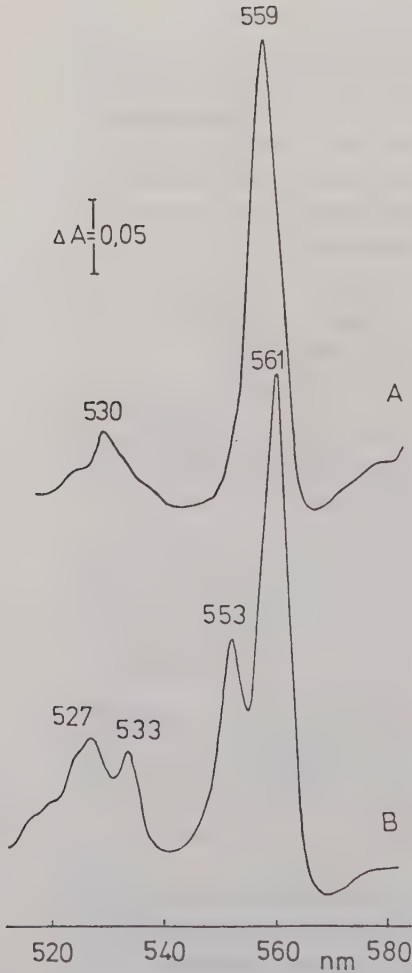


Abb.14

Tieftemperatur-Differenz-Spektren bei -196°C des im K-III' integrierten Cyt.b_{III}

A) Häm-Zentrum b_K

B) Häm-Zentrum b_T

Das Häm-Zentrum b_K des Cyt.b_{III}

wurde dargestellt durch das

Differenzspektrum :

Ascorbat (5 mM) + TMPD (50 μM)
gegen Ascorbat (5 mM)

Das Häm-Zentrum b_T wurde darge-
stellt durch das Differenz-
spektrum :

Dith. gegen Ascorbat/TMPD

Proteinkonz.: 0,3 mg/ml

Schichtdicke: 0,2 cm

Neben der Absorption des Häm-Zentrums bei 415 nm im oxi-
dierten Zustand tritt eine weitere Absorptionsbande im UV-
Bereich auf, die ein Absorptionsmaximum bei etwa 280 nm be-
sitzt. Bei der Aufnahme eines Absolut-Spektrums wie in Abb.15

ist diese Absorption der aromatischen Aminosäuren des Proteins durch die Absorption des am K-III' gebundenen Triton überlagert. Bei Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten für Protein und Triton und Berücksichtigung der gemessenen Triton-Bindung von 0,2 g/g Protein (s. 3.2.2.2.) ist etwa 80 % der Absorption bei 280 nm den aromatischen Aminosäuren des Proteins und etwa 20 % dem gebundenen Triton zuzuordnen.

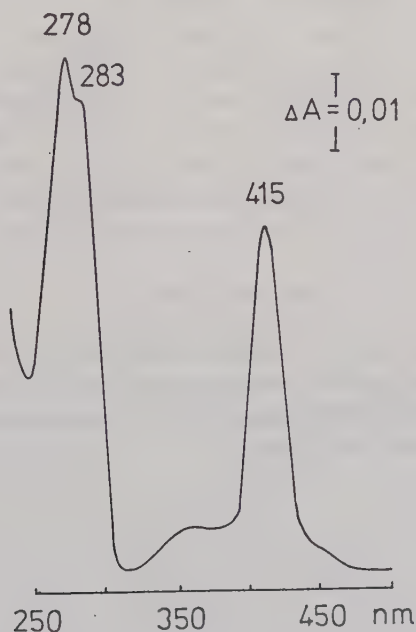


Abb.15 UV-Absorptionssignale des Triton-bindenden Komplex III'.

Der K-III' war gelöst in 0,025 % Triton, 50 mM NaCl, 20 mM Mops pH 7,2. Die Referenzküvette enthielt denselben Puffer. Die Absorption bei 415 nm dieses im oxidierten Zustand vorliegenden K-III' ist den Häm-Signalen der Cytochrome b_{III}^u zuzuordnen. Die Absorptionen um 280 nm setzen sich aus den Absorptionen des Proteins und des Protein-gebundenen Triton zusammen.

Zur Feststellung einer Veränderung des Proteins wird neben den enzymatischen Tests und den Redoxpotentialmessungen auch die Reaktivität gegenüber CO herangezogen. Beim Einleiten von CO in die Küvette des bei Raumtemperatur mit Dithionit reduzierten K-III' konnte keine Veränderung des Spektrums festgestellt werden, was allgemein als Kriterium eines intakten Häm-Proteins angesehen wird (112). Als weiteres Kriterium zur Abschätzung des Ausmaßes einer Schädigung des Proteins können die Redoxpotentiale herangezogen werden. Abb.16 zeigt die Redoxtitrationskurve des im K-III' integrierten Cytochrom b_{III} bei pH 7,0. Die Analyse (113) der sich überlagernden Titrationskurven beider Komponenten führt zu dem Ergebnis eines etwa gleichen Anteils beider Häm-Zentren an der Titrationskurve, wenn für beide Häm-Zentren der gleiche Extinktionskoeffizient angenommen wird. Die Mittelpotentiale bei pH 7 sind :

$$E_{m7} = 100 \text{ mV für Häm-Zentrum } b_K \quad \text{und}$$

$$E_{m7} = 10 \text{ mV für Häm-Zentrum } b_T$$

Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich mit den Mittelpotentialen in Mitochondrien (114) eine Verschiebung um 50 mV in positiver Richtung.

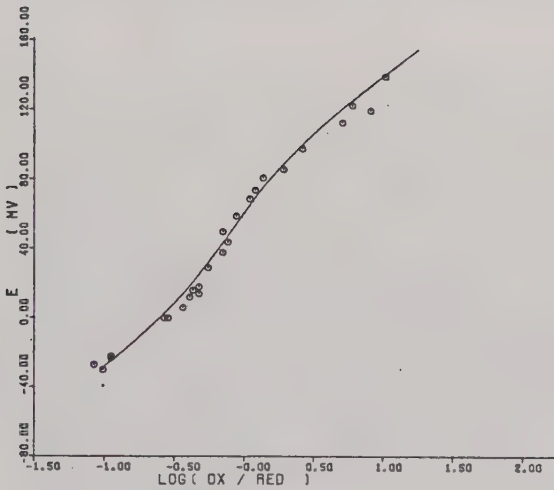


Abb.16 Nernst-Auftragung des im Komplex III' integrierten Cytochrom b_{III} . Es wurde bei pH 7 titriert. Die Reduktion erfolgte mit Dithionit, die Reoxidation mit Ferricyanid.

3.2.2.4. Antimycinbindung und Stabilität

Im Laufe der Entwicklung der neuen Methode zur Präparation des K-III' zeigte es sich, daß die Inkubation der Mitochondrien mit Antimycin zu einer Stabilisierung des K-III' auf der HA-Säule führt. Eine Präparation analog zu den Präparationsmethoden 1-4 (Tab.4) ohne Ant. ist nicht möglich. Das Protein wird offenbar stark geschädigt, was durch das Verschwinden des Absorptionssignals des Cyt.b_{III} angezeigt wird. Zur Bestimmung der Ant.-Bindung am K-III' wurde die Präparation unter Verwendung von ³H-Antimycin bei der Inkubation der Mitochondrien verwendet. Die gemessene Ant.-Bindung im K-III'-Eluat der HA-Säule betrug 1 Mol Ant. pro Mol K-III'-Monomer. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (112,115) überein, jedoch muß hier wegen der nach 3.3.2. bestimmten Stöchiometrie von 1 Mol Cyt.b pro Mol K-III'-Monomer eine Bindung von 1 Mol Ant. pro Mol Cyt.b (anstelle von 1 Mol Ant. pro 2 Mol Cyt.b) gefordert werden.

Die Ant.-Bindung macht den K-III' so stabil, daß er im Elutionspuffer (0,05 % Triton, 150 mM NaPi, 1 mM NaN₃, pH 7,2) bei 4 °C über mehrere Wochen ohne Veränderung der Absorptionsspektren oder der Redoxpotentiale beständig ist. Einfrieren dieser Lösung führt jedoch zur teilweisen Zerstörung des Komplexes, was sich in einer Abnahme der Absorption des Cyt.b_{III} bemerkbar macht. Wird der Komplex dagegen dialysiert gegen 10 mM Mops, 1 mM NaN₃, pH 7,2, so kann der aggregierte Komplex bei 25 000 g abzentrifugiert und eingefroren werden. In diesem Fall ist das K-III'-Sediment über Monate stabil. Es kann mit Hilfe von Triton- und Salz-haltigen Pufferlösungen wieder gelöst werden.

3.3. Isolierung und Charakterisierung des Cytochrom b aus dem Komplex III'

Die Isolierung des Cyt.b_{III} in einem weitgehend nativen Zustand wurde bisher als ein äußerst schwieriges Problem angesehen, da die Spaltung des Komplexes nur unter drastischen Bedingungen möglich ist. Oft kommt es zur Denaturierung des Cyt.b_{III} und zur Aggregation von Protein-Untereinheiten des Komplexes, die nur mit aggressiven ionischen Detergentien wie SDS oder Cetyltrimethylammoniumbromid wieder dispergiert werden können. Die neue Präparationsmethode ist offensichtlich in den Bedingungen der Spaltung noch schonend genug, um Denaturierungen und Aggregationen weitgehend zu vermeiden.

3.3.1. Isolationsgang

Der mit Ant. beladene K-III', der im Elutionspuffer (0,05 % Triton, 150 mM NaPi, 1 mM NaN₃ pH 7,2) vorliegt wurde mit 0,05 % Triton, 1 mM NaN₃ pH 7,2 im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Bei dieser Phosphat-Konzentration bindet der K-III' wieder an HA. Der gebundene Komplex wird mit einem Säulenvolumen des Puffers 0,05 % Triton, 35 mM NaPi, 50 mM NaCl, 1 mM NaN₃ pH 7,2 äquilibriert. Es soll hier eine Präparation ausgehend von 350 mg des K-III' beschrieben werden. Die 350 mg des K-III' können an 100-150 ml HA gebunden werden. Die Präparation des Cyt.b_{III} beginnt mit der Spaltung des Komplexes durch die hohe Guanidin-Konzentration in Puffer 1 (s.Abb.17). Das zur Spaltung verwendete Puffervolumen soll etwa 2/3 des HA-Volumens betragen. Dieser Spaltungspuffer selbst führt zur Elution der Proteine Cyt.b_{III}, Core 1 und 2, MG-12 und MG-11. Zur Entfernung des Guanidins vom Cyt.c₁

Bindung des K-III' an HA (HA-I)

Spaltung des K-III' mit Puffer 1)

- 1) Triton : 1 %
NaPi : 25 mM pH 7,2
NaCl : 200 mM
Guanidin : 1,5 M
- 2) Triton : 0,5 %
NaPi : 85 mM pH 7,2
NaCl : 250 mM
NaN₃ : 1 mM

Im Durchlauf:

Cyt.b_{III}, Core 1 u.2, MG-12 u. MG-11

Elution des Cyt.c, zusammen mit den MG-9- und MG-4-Proteinen

Sephadex G-25-Säule in Puffer 3)

- 3) Triton : 0,5 %
NaPi : 20 mM pH 7,2
NaCl : 200 mM
NaN₃ : 1 mM

Bindung der Proteine Core 1 u.2 und MG-11 an HA (HA-II)

Im Durchlauf:

Cyt.b_{III} u. MG-12-Protein

Elution der Core-Proteine mit Puffer 2)

Separation von Cyt.b_{III} und MG-12-Protein durch Gelchromatographie an Sephadex G-200 in Puffer 4)

- 4) Triton : 0,05 %
NaCl : 200 mM
Mops : 10 mM pH 7,2
NaN₃ : 1 mM

Abb.17 Präparationsschema zur Isolierung des Cytochrom b_{III} und weiterer Untereinheiten des Komplex III'

auf der HA-Säule I wird mit einem Säulenvolumen des Puffers 2) nachgespült. Cytochrom c_1 , MG-9- und MG-4-Protein bleiben unter diesen Bedingungen an HA gebunden. Sofort nach der Spaltung des K-III' und der Elution der Cyt.b_{III}-Fraktionen wird das Guanidin mittels einer Sephadex G-25-Säule (600 ml; äquiliibriert mit Puffer 3) entfernt. Die Elutionsfraktionen werden auf eine weitere HA-Säule (HA-II; Äquiliibriierung mit Puffer 3) aufgetragen, gefolgt von einem Säulenvolumen des Puffers 0,5 % Triton, 200 mM NaCl, 10 mM Mops, 1 mM NaN₃ pH 7,2 .

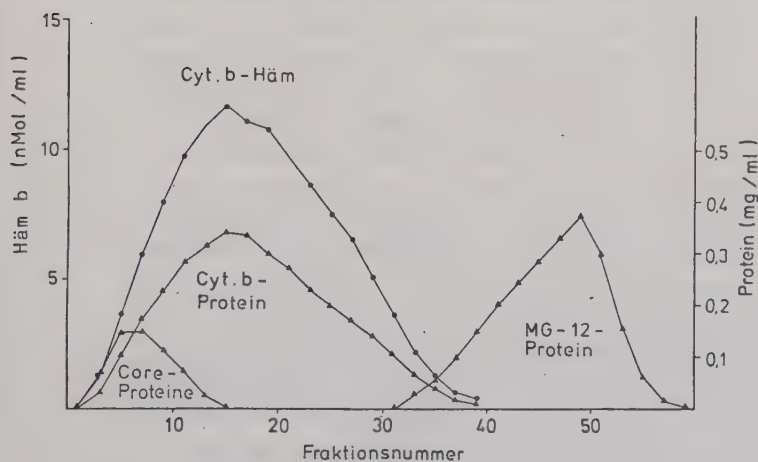


Abb.18 Trennung des Cyt.b_{III} vom MG-12-Protein mittels Gelchromatographie an Sephadex G-200 in 0,05 % Triton, 200 mM NaCl, 1 mM NaN₃ und 10 mM Mops pH 7,2. Die gepunktete Kurve gibt die Cyt.b_{III}-Konzentrationen wieder. Die Dreiecke stehen für die Protein-Konzentrationen der einzelnen Protein-Komponenten. In den Bereichen mit Überlappung des Cyt.b u. der Core-Proteine bzw. des Cyt.b u. des MG-12-Proteins wurde der aus den Cyt.b-Spektren bestimmbare Protein-Anteil des Cyt.b (42 nMol Häm b/mg Prot.) von der Gesamtprotein-Kurve (Lowry) abgezogen.

Das MG-12-Protein und 60-70 % des aufgetragenen Cytochrom b_{III} passieren die Säule ungebunden, während die Core-Proteine bis auf einen Rest von etwa 5 % an HA-II binden. Zur Separation des Cyt. b_{III} und des MG-12-Proteins wird nach Druckfiltration an einer Amicon XM-100-Membran auf eine Sephadex G-200-Säule von 1 m Länge aufgetragen (Abb.18). Das aufgetragene Volumen soll 2 % des Gelvolumens nicht überschreiten. Die Protein-Konzentration zur Auftragung soll ≤ 10 mg/ml, die Triton-Konzentration nicht mehr als 5 % betragen. Die Chromatographie an Sephadex G-200 ermöglicht eine teilweise Abtrennung der Core-Proteine und des MG-12-Proteins vom Cyt. b_{III} . Etwa 45 % des aufgetragenen Cyt.b sind elektrophoretisch rein, während 45 % durch die Core-Proteine und 10 % durch das MG-12-Protein überlagert bleiben. Der durch die Core-Proteine verunreinigte Anteil des Cyt. b_{III} kann mittels einer Chromatographie an Sephadex G-100 in 2 % SDS als elektrophoretisch reines Apoprotein des Cyt.b gewonnen werden (Abb.19). Aus der optischen Dichte und den nach Lowry bestimmten Protein-Konzentrationen konnte der Absorptionskoeffizient des Apoproteins bei 280 nm zu $\epsilon = 2,5$ ($l\ g^{-1}\ cm^{-1}$) bestimmt werden. Der Vergleich mit dem Absorptionskoeffizienten des AdN-Carriers aus Rinderherzmitochondrien ($\epsilon = 1$ ($l\ g^{-1}\ cm^{-1}$)) zeigt deutlich den hohen Anteil des Tryptophan an der Gesamtaborption des Cyt.b, denn der Anteil der anderen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin ist in beiden Proteinen annähernd identisch (116).

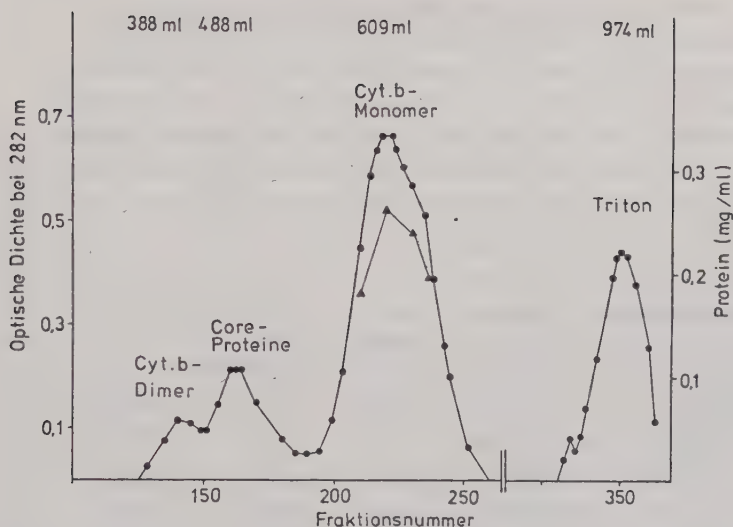


Abb.19 Chromatographie des Cyt.b_{III} bei Raumtemperatur in 2 % SDS an einer Sephadex G-100-Säule zur Abtrennung von Core-Proteinen.

Die gepunktete Kurve gibt die optische Dichte bei 282 nm wieder, die prop.zur Protein- bzw. Triton-Konzentration ist. Die Dreiecke geben die nach Lowry gemessene Proteinkonz.an.
Säulendimensionen : Volumen = 1200 ml ; Höhe = 100 cm ;
Innendurchmesser = 4 cm ; Fließgeschwindigkeit = 15 ml/ Stunde

Die Auftragung des durch Core-Proteine verunreinigten Cyt.b erfolgte nach Fällung der Proteine mit ≤ 40 % Aceton (-15°C) und Auflösung des Niederschlages in 5 % SDS, 5 % Mercaptoethanol bei Raumtemperatur (12 h), wobei die Protein-Konzentration bei 3 mg/ml lag.

Die Säule trennt sowohl höhermolekulare Bestandteile, die als dimerisierte und zum Teil höher aggregierte Cyt.b-Anteile angesehen werden (Elutionsmaximum bei 388 ml) als auch den Anteil der Core-Proteine (Elu.max.: 488 ml) deutlich vom monomeren Cyt.b (Elu.max.: 609 ml) ab. Um 974 ml eluiert der Rest des Triton, der durch die Acetonfällung nicht abgetrennt wurde.

Die eigentlichen Anreicherungs-schritte der Cyt.b_{III}-Präparation sind die Chromatographien an der zweiten HA-Säule und an der Sephadex G-200-Säule. Die Abtrennung der Proteine Cyt.c₁, MG-9 und MG-4 erhöht das b/P-Verhältnis nur unwesentlich. Dennoch ist dieser Schritt, nicht nur wegen der Notwendigkeit der Spaltung, sondern auch wegen der quantitativen Abtrennung des Cyt.c₁ sehr wertvoll.

Präparationsstufe	Protein (mg)	Häm b (nMol)	b/P (nMol/mg)	Ausbeute (%)
Komplex III'	350	3000	8,6	100
Nach HA-I	300	2700	9	90
Nach Sephadex G-25	300	2700	9	90
Nach HA-II	105	1900	18	63
Nach Sephadex G-200	≤ 15 (≤ 34)	≤ 600 ≤ 1200	≥ 40 ≥ 35	≤ 20 ≤ 40)

Tab.9 Anreicherung und Ausbeute an Cyt.b_{III} bei den einzelnen Präparationsschritten.

3.3.2. Charakterisierung des Cytochrom b aus Komplex III'

Das Cyt.b_{III} ist das Protein des K-III; dem die größte Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Trotz der Fülle von experimentellen Daten über das im K-III' integrierte Cyt.b blieb jedoch die Frage nach seiner Funktion offen. Die vorliegende Charakterisierung des relativ schonend isolierten Cyt.b soll die Grundlage für spätere Studien zur Funktion liefern.

3.3.2.1. Polypeptid- und Aminosäurezusammensetzung

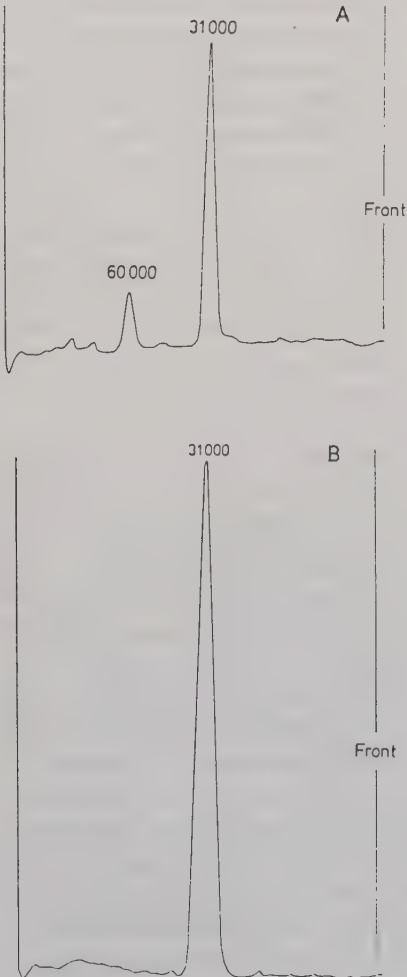


Abb.20

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Cyt.*b*_{III} nach der Sephadex G-200-Säule in Triton (A) und des Cyt.*b*-Apoproteins nach der Sephadex G-100-Säule in SDS (B).

In (A) ist neben dem Monomeren, dem in diesem Gelelektrophorese-System (Neville und Glossmann : 17 / 0,75) ein MG von 31 000 zugeordnet wird, eine Bande bei einem MG von 60 000 zu sehen, die als dimerisiertes Cyt.*b* angesehen wird.

Das Densitogramm (B) zeigt nur den Cyt.*b*-Monomer. Die Präparation ist frei von Verunreinigungen und Cyt.*b*-Oligomeren.

Densitometrische Messung bei 546 nm nach Anfärbung mit Coomassie-Blue-G-250.

Die Aminosäurezusammensetzung des Cyt.b_{III} in Tab.10 zeigt einen hohen Gehalt an nichtpolaren Aminosäuren, im wesentlichen Leucin und Isoleucin und einen niedrigen Gehalt an Lysin und Arginin.

Aminosäure	Mol %	Tab.10 Aminosäurezusammensetzung
Asparaginsäure	7,48	des Cyt.b _{III}
Threonin ^a	7,61	^a Extrapoliert auf t=0
Serin ^a	5,94	^b Hydrolysezeit : 120 h
Glutaminsäure	3,50	
Prolin	5,92	
Glycin	6,63	
Alanin	7,22	
Cystein	0,96	
Valin	4,72	
Methionin ^b	3,77	
Isoleucin ^b	9,42	
Leucin	15,68	
Thyrosin	3,97	
Phenylalanin	6,21	
Tryptophan	3,03	
Lysin	2,70	
Histidin	3,09	
Arginin	2,16	

Die niedrige Polarität von 0,32 ist charakteristisch für ein integrales Membranprotein. Fest-Phasen-Edman-abbau des an Glas gebundenen Proteins über 15 Schritte führte zu einem ansteigenden unspezifischen Untergrund von Phenylthiohydantoin-Aminosäuren, wie für ein Protein erwartet werden kann, dessen Aminoende blockiert ist. Nach Inkubation in Methanol/Salzsäure (1,5 h in 0,5 M HCl bei 25 °C) wurde ein Methioninrest im ersten Abbauschritt freigegeben, dem Glycin im zweiten Schritt folgte. Dieses Ergebnis deutet auf einen N-Formylmethionin-N-Terminus hin. Die ersten 17 Schritte der Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes und die 17 Schritte der Aminosäuresequenz eines Bromcyan-Bruchstückes geben keinerlei Hinweis auf die Existenz zweier verschiedener Cytochrome b im K-III. Das partielle spezifische Volumen des Cyt.b_{III} wurde aus der Aminosäureanalyse zu 0,757 ml/g berechnet.

3.2.2.2. Hydrodynamische Eigenschaften

Wie beim K-III' ist zur Bestimmung des Molekulargewichtes bzw. des Aggregationszustandes mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge die Kenntnis des gebundenen Triton erforderlich. Anders als der K-III' konnte das Cyt.b_{III} jedoch nicht an ein Säulenmaterial gebunden werden. Deshalb wurde die Triton-Bindung durch Chromatographie an Gelsäulen bestimmt. Beim Vergleich verschiedener Materialien zur Gelfiltration (Sephadex G-100, G-150, G-200 und Sepharose 6B-C1) erwies sich Sephadex G-200 für die Abtrennung der Triton-Micellen vom Cyt.b_{III} als das geeignetste. Zur Auswertung wurde die spezifische Radioaktivität des ³H-Triton herangezogen. Es wurde eine Triton-Bindung von 1,9 g Triton pro g Protein bestimmt (Abb.21).

Mit der analytischen Ultrazentrifuge wurden Sedimentations-Gleichgewichtsläufe durchgeführt. Die Sedimentation des Proteins wurde über die Absorption des Cyt. b_{III} bei 415 nm im oxidierten Zustand verfolgt. Die graphische Darstellung der Sedimentations-Gleichgewichtsläufe (Abb.22) ergibt eine Gerade, die die Homogenität der Präparation anzeigt. Nach Korrektur für das gebundene Triton (1,9 g/g Protein) resultiert ein Molekulargewicht von 55 000. Das minimale MG läßt sich aus dem b/P-Verhältnis von 42 nMol/mg zu 23 800 D berechnen. Die Annahme eines Cyt.b-Dimers mit einer Häm-Gruppe pro Untereinheit lag nahe. Nachdem nun jedoch die DNA-Sequenz des Cyt.b aus Rinderherzmitochondrien vorliegt (141), derzufolge das Cyt.b ein Molekulargewicht von 42 500 (ohne Häm) besitzt, muß diese Möglichkeit ausgeschlossen werden und die Existenz eines einzigen Cyt.b-Proteins (im K-III-Monomer) mit zwei Häm-Zentren gefordert werden (siehe 4.3.).

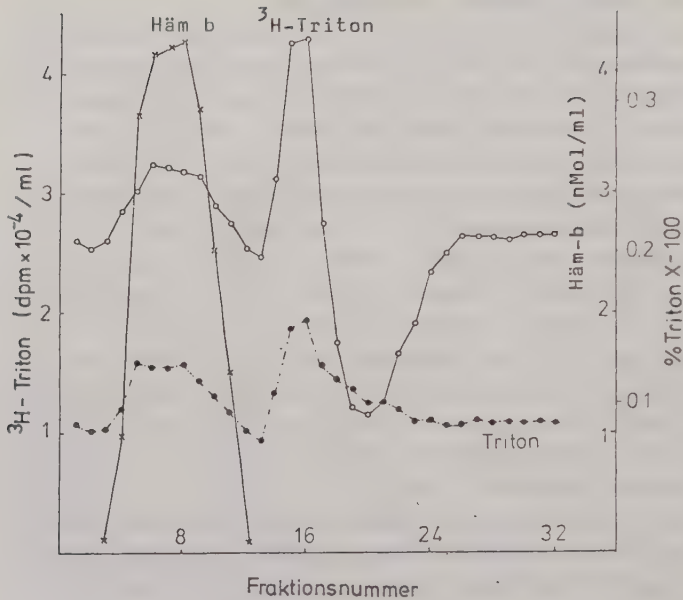


Abb.21 Bestimmung der spezifischen Triton-Bindung an Cyt.*b*_{III} durch Chromatographie an Sephadex G-200 unter Verwendung von $^3\text{H-Triton X-100}$.

x-x Häm b (nMol/ml)

o-o $^3\text{H-Triton X-100}$ (dpm $\times 10^{-4}$ /ml)

o-o Triton (%) (aus der Absorption bei 280 nm)
 (Im Bereich des Cyt.*b*-Proteins ist die Absorption
 des Triton durch die Eigenabsorption des Proteins
 überlagert)

Die Protein-Konzentrationen wurden aus den Häm-Konzentrationen berechnet (42 nMol Häm / mg Protein).

Die Säule wurde mit einem $^3\text{H-Triton}$ enthaltenden Puffer äquilibriert (0,06-0,1 % Triton). Die Salzkonzentrationen waren 200 mM NaCl, 5 mM NaN_3 , 10 mM Mops pH 7,2.

Säulendimensionen : 1 x 100 cm

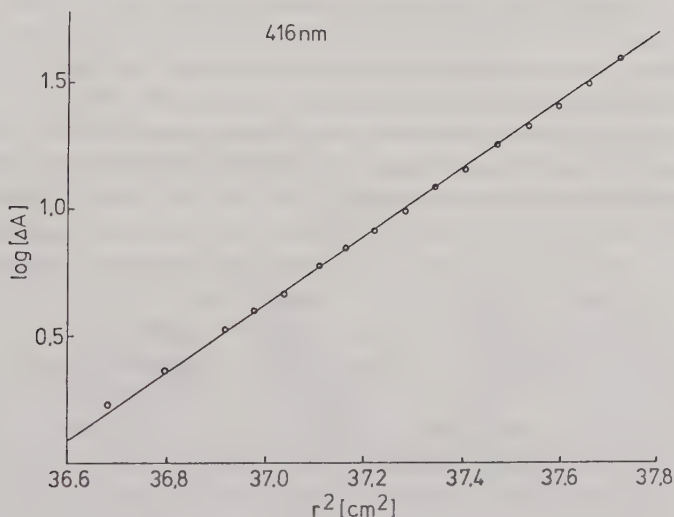


Abb. 22 Sedimentations-Gleichgewichtslauf des Cyt. b_{III} in Triton. Der Logarithmus der Schreiberauslenkung in mm (prop. zur Absorption) ist gegen das Quadrat des Abstandes r^2 vom Rotationszentrum (cm^2) aufgetragen. Die Rotorgeschwindigkeit war 24 000 UpM, die Protein-Konzentration 1,5 mg/ml. Das Gleichgewicht war nach 24 h erreicht. Das Protein wurde bei 416 nm im oxidierten Zustand verfolgt. Die Temperatur lag bei 22,5 °C.

Die Bestimmung des Stokes-Radius des Cyt. b_{III} wurde auf der gleichen Sepharose 6B-Cl-Säule und unter gleichen Bedingungen bestimmt wie der Stokes-Radius des K-III' (3.2.2.2.). Der so ermittelte Stokes-Radius liegt bei 5,65 nm.

3.3.2.3. Spektrale und potentiometrische Eigenschaften des Cytochrom b_{III}

Abb.23 zeigt die Absolut-Absorptionsspektren des Cyt. b_{III} im oxidierten und im reduzierten Zustand. Im oxidierten Zustand absorbiert das Protein bei 415 nm mit einem über Pyridinhämochromogenmessungen bestimmten Absorptionskoeffizienten von $\epsilon_{415}^{ox.} = 116 \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$ pro Häm-Zentrum.

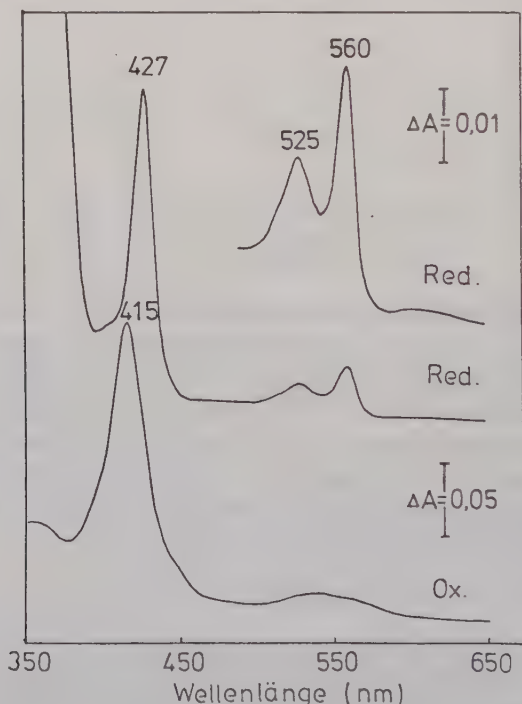


Abb.23 Absolut-Absorptionsspektren des Cyt. b_{III} im oxidierten (A) und im reduzierten Zustand (B) bei Raumtemperatur. Die Referenz-Küvette ist dabei Protein-frei, enthält jedoch den gleichen Puffer wie die Messküvette (0,5 % Triton, 250 mM NaCl, 85 mM NaPi pH 7,2).

Im reduzierten Zustand (Reduktion mit Dithionit) treten Absorptionsmaxima im α -Bereich bei 560 nm, im β -Bereich bei 525 nm und im γ -Bereich bei 427 nm auf. Die Reduktion des Cyt.b muß bei möglichst niedriger Dithionit-Konzentration erfolgen, da eine Zugabe von mehr Dith. innerhalb weniger Minuten zum Verlust des Absorptionsspektrums führt. Wegen dieser Empfindlichkeit gegenüber Dith. wurde für die Messung der Cyt.b-Konzentration nur die Absorption bei 415 nm im oxidierten Zustand herangezogen.

Bei -196°C verschieben sich die Absorptionsmaxima um 2 nm zu kürzeren Wellenlängen. Die Häm-Zentren des Cyt.b bleiben aber, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei -196°C im Gegensatz zu dem im K-III' integrierten Cytochrom b_{III} spektral ununterscheidbar. Das isolierte Cyt. b_{III} reagiert im Gegensatz zu dem des K-III' mit CO und ist autoxidabel. Eine mit Dithionit reduzierte Cyt. b_{III} -Präparation liegt nach einer 5 Min. dauernden Chromatographie an Sephadex G-25 wieder oxidiert vor. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Häm-Zentren im isolierten Cyt. b_{III} wird erst durch Redoxpotential-Messungen möglich.

Die Redoxtitration wurde unter Verwendung von Redoxmediatoren durchgeführt (Abb.24). Die Analyse nach Wilson und Dutton (113) führt zu dem Ergebnis, daß zwei Komponenten zu gleichen Anteilen zu den Absorptionsänderungen beitragen. Bei pH 7,0 liegt das Mittelpotential für die Komponente mit hohem Potential bei $E_{\text{m}7} = -5 \text{ mV}$ und für die Komponente mit tiefem Potential bei $E_{\text{m}7} = -85 \text{ mV}$. Die Mittelpotentiale sind um $\sim 100 \text{ mV}$ negativer als im isolierten K-III'.

Bei pH 8,0 ist das Mittelpotential des isolierten Cyt. b_{III} um $\sim 40 \text{ mV}$ negativer als bei pH 7,0. Die Mittelpotentiale liegen bei $E_{\text{m}8} = -35 \text{ mV}$ und $E_{\text{m}8} = -125 \text{ mV}$.

Die pH-Abhängigkeit der Mittelpotentiale des isolierten Cytochrom b ist die gleiche wie für das Cyt.b im isolierten K-III bzw. für das Cyt.b aus Komplex III, der noch in der Mitochondrienmembran integriert ist (114).

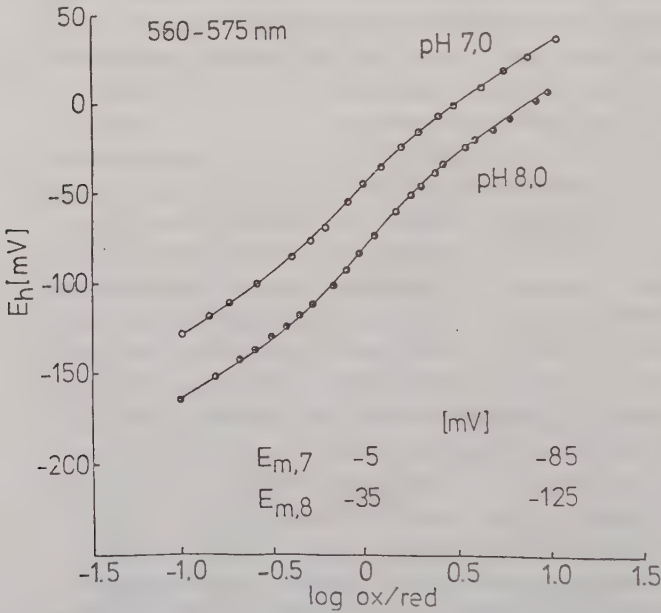


Abb.24 Nernst-Auftragung von Redox titrationen des isolierten Cytochrom b_{III} bei pH 7,0 und pH 8,0. Die Titrationen wurden in Richtung zum negativen Potential durch Zugabe von Dith. und in Richtung zum positiven Potential mit Ferricyanid titriert. Der Inkubationspuffer enthielt 0,5 % Triton, 100 mM Tris-HCl, 100 mM Mops. Es wurde bei 25 °C und einem Lichtweg von 5 mm gearbeitet.

3.3.2.4. Untersuchungen zur Antimycin-Bindung und zur Stabilität

Der K-III' mit gebundenem ^3H -Ant. wurde nach dem Präp.-schema (Abb.17) gespalten und weiterverarbeitet. Die Radioaktivität der einzelnen Eluate wurde untersucht. Es zeigte sich, daß die ^3H -Ant.-Markierung in der Fraktion der Proteine Cyt.b_{III} und MG-12 zu finden ist. Nach der Chromatographie der beiden Proteine an Sephadex G-200 (analog zu Abb.18) ist die Cyt.b_{III}-Fraktion frei von ^3H -Ant. Das ^3H -Ant. eluiert zusammen mit den Triton-Micellen und dem MG-12-Protein. Zur Unterscheidung, ob das ^3H -Ant. in den Triton-Micellen gelöst ist, oder ob es an das MG-12-Protein bindet, wurde die ^3H -Ant. enthaltende Fraktion mit dem 5-fachen Volumen des Puffers 10 mM Mops, 1 mM NaN_3 pH 7,2 verdünnt und auf eine HA-Säule aufgetragen. Unter diesen Bedingungen bindet das MG-12-Protein an HA, während die Triton-Micellen ungebunden die Säule passieren. Die ^3H -Ant.-Aktivität befindet sich im Durchlauf der HA-Säule, während das Eluat des MG-12-Proteins (Elution durch 0,5 % Triton, 250 mM NaCl, 85 mM NaPi, 1 mM NaN_3 pH 7,2) keine ^3H -Ant.-Aktivität aufweist. Mit dem beschriebenen Verfahren konnte keine Ant.-Bindung an irgendein Protein des aufgespaltenen K-III' festgestellt werden. Die Vermutung lag nahe, daß die Dissoziationskonstante des Ant. ($K_D = 3 \times 10^{-10} \text{ M}$) (117) am Komplex III durch die Spaltung mit Guanidin erhöht worden sein könnte, aber trotzdem noch eine meßbare Bindungskonstante am entsprechenden Protein existiert . Aus diesem Grund wurde eine Gelchromatographie mit dem Cyt.b_{III}, dem wahrscheinlichsten Kandidaten für die Bindung des Ant. unter Verwendung von ^3H -Ant. im Puffer durchgeführt. Da auch unter diesen Bedingungen keine Bindung von Ant. an Cyt.b_{III} festgestellt werden konnte, müßte die Dissoziationskonstante mindestens auf $K_D > 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ erhöht worden sein.

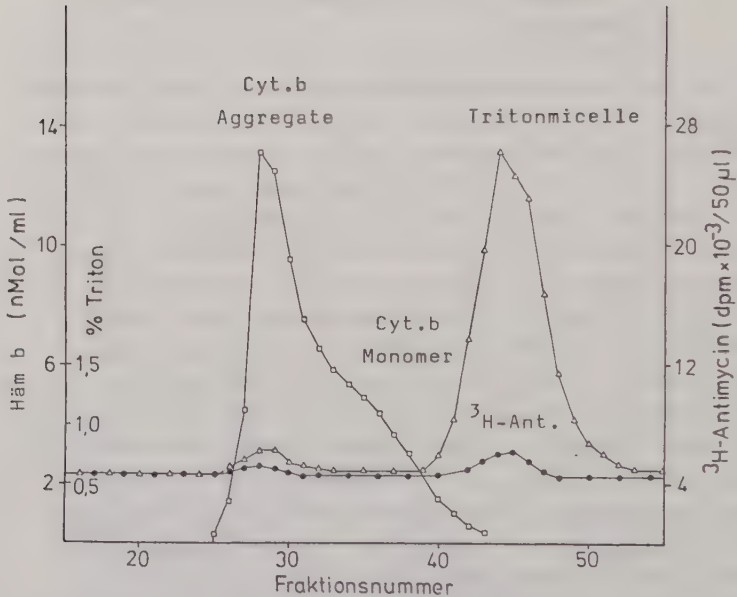


Abb. 25 Chromatographie des isolierten Cyt. b_{III} an Sephadex G-200 in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ ^3H -Ant. Bei den vorgegebenen Bedingungen konnte keine Bindung von Ant. an Cyt. b_{III} festgestellt werden. Vor der Auftragung wurden 40 nMol Ant.-freies Cyt. b_{III} mit 24 nMol ^3H -Ant. 60 Min. lang inkubiert. (Dies ist weniger Ant. als bei Annahme einer 1:1-Stöchiometrie zur Absättigung der Bindungsstellen notwendig ist.)

Äquilibrierungspuffer : 0,1 % Triton, 200 mM NaCl, 10 mM Mops, 5 mM NaN_3 , $1 \mu\text{M}$ ^3H -Ant., pH 7,2

Die spezifische Aktivität des ^3H -Ant. im Äquilibrierungspuffer war dieselbe wie bei der Inkubation vor der Auftragung.

□—□ Häm b (nMol/ml)

●—● ^3H -Ant. (dpm $\times 10^{-3}$ / 50 μl)

△—△ Triton (%) (aus der Absorption bei 280 nm und Vernachlässigung der Protein-Eigenabsorpt.)

Säulendimensionen : Volumen = 80 ml, Höhe = 1 m; innerer Durchmesser = 1 cm; Fließgeschw.: 1,5 ml/h

Das ^3H -Ant. war in den Tritonmicellen wiederzufinden, die sich deutlich vom Cyt.b_{III} abtrennen ließen. Ein großer Teil der Cyt.b_{III}-Präparation war allerdings infolge zu weitgehender Druckfiltration aggregiert und eluierte deshalb am Ausschlußvolumen der Säule. Der geringe Überschuß an ^3H -Ant. in den Cyt.b-Fractionen über der vorgegebenen ^3H -Ant.-Konzentration im Äquilibrierungspuffer ist auf die erhöhte Triton-Konzentration infolge der Triton-Bindung des Proteins zurückzuführen. Der Verlauf der ^3H -Ant.-Aktivität gibt deshalb nur den Verlauf der Triton-Konzentration wieder.

Obwohl Antimycin zumindest nach der Spaltung des K-III' mit Guanidin nicht mehr an das Cyt.b_{III} bindet und das freigesetzte Ant. auf der Sephadex G-200-Säule vom Cyt.b getrennt wird, zeigt das Cyt.b eine überraschende Stabilität. Die Cyt.b_{III}-Präparation in 0,05 % Triton, 200 mM NaCl, 1 mM NaN_3 , 10 mM Mops pH 7,2 ist bei 4 °C wochenlang ohne Veränderung des Absorptionsspektrums im oxidierten Zustand stabil. Einfrieren und Wiederauftauen dieser Lösung kann dagegen zur Abnahme der Absorption führen. Frieren und Tauen begünstigt außerdem die Aggregation des Cyt.b_{III}. Die Tendenz des sehr hydrophoben Proteins zur Aggregation zeigt sich auch bei der Konzentrierung durch Druckfiltration zu Protein-Konzentrationen über 3 mg/ml. Zur Prüfung auf Aggregationen kann die Probe auf Sephadex G-200 oder Sepharose 6B-C1 chromatographiert werden. Die Aggregate eluieren wegen ihres größeren Durchmessers vor dem Cyt.b-Monomer. (Abb.18 zeigt die Elution des nicht aggregierten Cytochrom b während in Abb.25 eine Aggregation festgestellt werden konnte.)

3.4. Anreicherung weiterer Untereinheiten des K-III'

Die Reinigung der weiteren Protein-Untereinheiten des K-III' ist die Voraussetzung für die Durchführung von Rekonstitutionsexperimenten. Sie ist ein Schritt auf dem Weg zur Aufklärung der Funktion der einzelnen Polypeptide, speziell der nicht Häm-tragenden. Der erste Schritt zur Isolierung der jeweiligen Untereinheit ist dem Schema der Cyt.b_{III}-Präparation zu entnehmen.

3.4.1. Präparation des Cytochrom c₁

Der gemeinsame Präparationsweg der Cytochrome b_{III} und c₁ verzweigt sich bereits bei der Spaltung des Komplexes mit Guanidin. Nach kurzem Spülen mit 0,5 % Triton, 250 mM NaCl, 85 mM NaPi, 1 mM NaN₃ pH 7,2 kann das Cyt.c₁ bei Raumtemperatur mit 0,5 % Triton, 300 mM NaPi, 1 mM NaN₃ pH 7,2 konzentriert eluiert werden. Das c₁/P-Verhältnis liegt bei 24 nMol Häm c₁/mg Protein, wenn der aus Pyridinhämochromogenbestimmungen ermittelte Extinktionskoeffizient von

$$\epsilon_{553-540 \text{ nm}}^{\text{Dith.-Fecy}} = 19 \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$$

und die Proteinbestimmung nach Lowry herangezogen werden. Bei Annahme eines Molekulargewichtes von 33 000 aufgrund der SDS-PAGE (Abb.26) entspricht dies einer Reinheit von 70 %. Wie das Densitogramm der SDS-PAGE zeigt enthält die Cyt.c₁-Präparation noch zwei kleine Untereinheiten des K-III' mit den Molekulargewichten 9 000 und 4 000. Dazu ist zu bemerken, daß eine Cyt.c₁-Präparation mit diesem Reinheitsgrad nur dann erhalten wird, wenn der verwendete K-III'elektrophoretisch rein war. Eventuelle Ver-

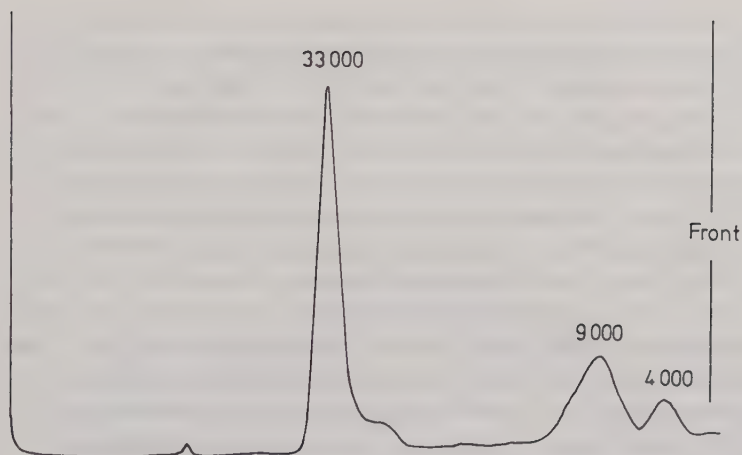


Abb. 26 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Cyt. c_1 -Fragmentes. Die Proteinbande bei 33 000 D ist die Häm-tragende Komponente. Die Proteine mit Molekulargewichten von 9 000 und 4 000 besitzen keine prosthetische Gruppe. Densitometrische Messung bei 546 nm nach Anfärbung mit Coomassie-Blue-G-250. (Neville und Glossmann : 17 / 0,75)

unreinigungen des K-III' kommen vor allem in der Fraktion des Cyt. c_1 wieder zum Vorschein. Versuche, das Cyt. c_1 in nativem Zustand weiter zu reinigen scheiterten. Die verwendeten Methoden waren : Acetonfällung, Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie. Aus diesem Grund wird angenommen, daß die Guanidinkonzentration von 1,5 M bei der Spaltung des K-III' nicht ausreicht, um auch das Cyt. c_1 von den Untereinheiten mit den Molekulargewichten 9 000 und 4 000 abzuspalten. Diese aus drei Proteinen bestehende Cyt. c_1 -Präparation soll deshalb als Cyt. c_1 -Fragment bezeichnet werden.

Die Abtrennung der beiden kleinen Proteine war bisher nur durch Chromatographie an Sephadex G-100 in 2 % SDS möglich, also unter denaturierenden Bedingungen. Da die Reinigung des nativen Proteins noch nicht abgeschlossen ist, beschränkt sich die weitere Charakterisierung auf die Beschreibung der spektralen und potentiometrischen Eigenschaften, sowie auf eine Abschätzung des Molekulargewichtes bzw. des Aggregationszustandes.

Tab.11 zeigt die Aminosäurezusammensetzung des Cyt. c₁-Fragmentes. Die Polarität liegt mit 48,3 % für ein Membranprotein sehr hoch. Wie von Bosshard et al.(118) gezeigt wurde, besitzt dieses Cyt.c₁-Fragment eine Bindungsstelle für Cytochrom c. Das aus der Aminosäureanalyse nach Cohn und Edsall bestimmte partielle spez. Volumen beträgt 0,737 (1/g).

Aminosäure	Mol %	Tab.11
Asparagin(säure)	8,2	Aminosäureanalyse des Cyt.c ₁ - Fragmentes
Threonin	4,6	
Serin	8,4	
Glutamin(säure)	12,5	
Prolin	6,1	
Glycin	5,5	
Alanin	7,3	
Cystein	2,7	
Valin	6,2	
Methionin	2,6	
Isoleucin	2,3	
Leucin	10,7	
Thyrosin	4,5	
Phenylalanin	3,7	
Histidin	3,0	
Lysin	5,4	
Arginin	6,2	

Die Bestimmung des Stokes-Radius erfolgte mit der Gel-filtrationsmethode. Der Stokes-Radius des Cyt.c₁-Fragmentes beträgt 5,9 nm (s. Abb.9).

Der aus Sedimentations-Geschwindigkeitsläufen erhaltene Sedimentationskoeffizient von 10 S erlaubt bei der gemessenen Triton-Bindung von 0,35 g/g Protein und dem aus dem Stokes-Radius ermittelten Diffusionskoeffizienten von $5,9 \times 10^{-7}$ ($\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$) die Abschätzung eines Molekulargewichtes von 220 000 D.

Die Triton-Bindung an das Cyt. c_1 -Fragment wurde ähnlich wie für Cyt. b_{III} durch Chromatographie an Sephadex G-200 in 0,05 % Triton, 200 mM NaCl, 10 mM Mops, 1 mM NaN_3 pH 7,2 bestimmt. Die spezifische Radioaktivität des dabei verwendeten ^3H -Triton X-100 wurde aus dem Vergleich der Radioaktivität und der spektralen Triton-absorption bei 280 nm bestimmt.

Lichtabsorptionsspektren des Cyt. c_1 -Fragmentes bei Raumtemperatur zeigen ein spektral unverändertes Protein. Das Red.-Ox.-Differenzspektrum des isolierten Cyt. c_1 -Fragmentes (Abb.27 A) ist im α -Bereich identisch mit dem Red.-Ox.-Spektrum des Cyt. c_1 , das bei Reduktion des K-III' mit Ascorbat erhalten wird (vgl. Abb.13 A). Der Extinktionskoeffizient ist unverändert.

$$\epsilon_{553-540 \text{ nm}}^{\text{Dith.-Fecy}} = 19 \text{ (mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{)}$$

Die Präparation des Cyt. c_1 -Fragmentes ist frei von anderen Cytochromen. Abb.27 B zeigt die Absorption des Cyt. c_1 im oxidierten Zustand. Das Cyt. c_1 -Fragment liegt nach Beendigung der Präparation in einem teilweise reduzierten Zustand vor und mußte deshalb zuerst mit Ferricyanid vollständig oxidiert werden. Das spektral interferierende Fecy wurde dann durch eine Chro-

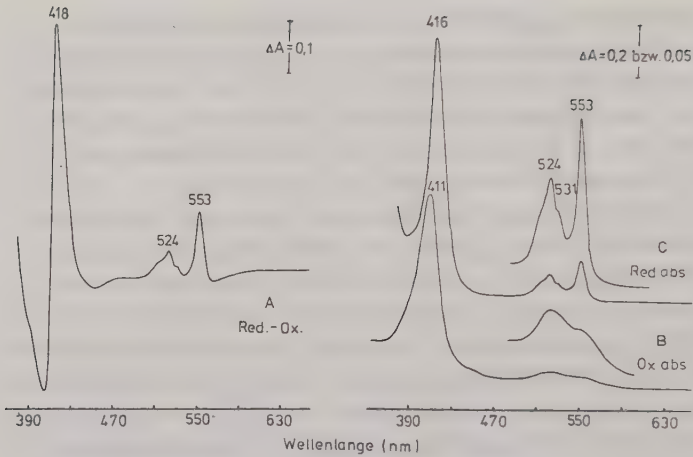


Abb.27 Lichtabsorptionsspektren des Cyt. c_1 -Fragmentes bei Raumtemperatur.

Spektrum A : Red.-Ox.-Differenzspektrum (Dith.-Fecy)

Spektrum B : Absolut-Spektrum im oxidierten Zustand

Spektrum C : Absolut-Spektrum im reduzierten Zustand

matographie an Sephadex G-25 wieder vom Cytochrom c_1 getrennt. In Abb.27 C ist das Absolut-Spektrum des reduzierten Cyt. c_1 wiedergegeben. Im Gegensatz zum Cyt. b_{III} ist das Cyt. c_1 -Fragment bei Reduktion mit Dithionit nicht spektral labil.

Die Redoxtitrationskurve ist im Gegensatz zum Cyt. b_{III} linear (Abb.28). Das Mittelpotential liegt sowohl bei pH 7 als auch bei pH 8 bei 250 mV, ist also pH-unabhängig.

Das isolierte Cyt. c_1 -Fragment ist über Monate bei 4 °C in 0,05 % Triton, 200 mM NaCl, 1 mM NaN_3 , 10 mM Mops pH 7,2 spektral stabil. Im Gegensatz zum Cyt. b_{III} und zum

K-III' kann eine Cyt. c_1 -Lösung ohne Veränderung der spektralen Eigenschaften gefroren und getaut werden. Die Tendenz zur Aggregation ist bei dieser Cyt. c_1 -Präp. wesentlich geringer als beim Cyt. b_{III} . Aggregationen konnten mittels Gelchromatographie nur in Proteinlösungen mit Protein-Konzentrationen über 10 mg/ml festgestellt werden.

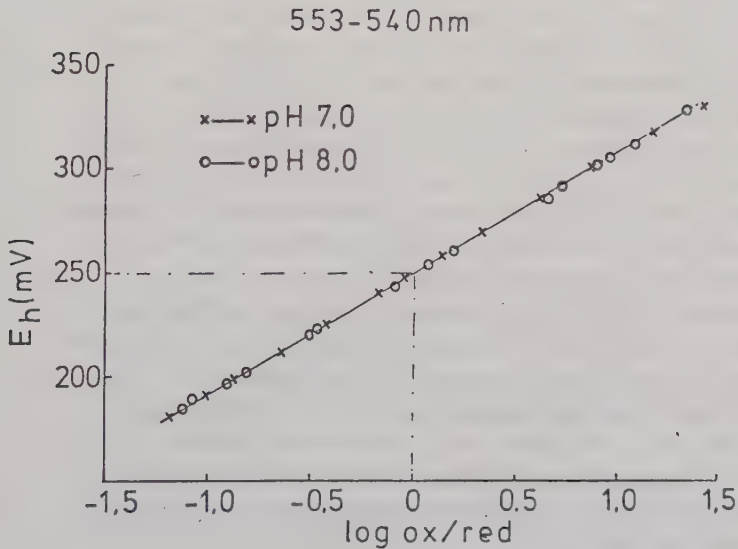


Abb.28 Nernst-Auftragung der Redox titration des isolierten Cyt. c_1 -Fragmentes.

x—x Titration bei pH 7,0

o—o Titration bei pH 8,0

Das Mittelpotential des Cyt. c_1 ist pH-unabhängig. Es liegt bei +250 mV.

3.4.2. Präparation der Core-Proteine

Die Verzweigung der Präparationen des Cyt.b_{III} und der Core-Proteine erfolgt an der zweiten HA-Säule (s.Abb.17;Präp.schema für Cyt.b_{III}). Während das Cyt.b_{III} und das MG-12-Protein die HA-Säule ungebunden passieren, binden die Core-Proteine und das MG-11-Protein an das Säulenmaterial. Nach dem Spülen mit 0,05 % Triton, 200 mM NaCl, 10 mM Mops pH 7,2, können 70-80 % der Core-Proteine mit 0,5 % Triton, 250 mM NaCl, 85 mM NaPi, 1 mM NaN₃ pH 7,2 eluiert werden. Wie das Densitogramm der SDS-PAGE (Abb.29) zeigt, ist die Präparation der beiden Core-Proteine (MG = 49 000 D u. 47 000 D) noch verunreinigt durch das MG-11-Protein. Eine weitere Verunreinigung, die zwar spektral, nicht aber in der SDS-PAGE in Erscheinung tritt, ist der Rest des an HA gebundenen Cyt.b_{III}. Nachdem eine Cyt.b_{III}-Bande trotz der relativ hohen Konzentration von 3 nMol Häm/mg Prot. im Densitogramm fehlt, wird angenommen, daß dieser Anteil des Cyt.b_{III} in aggregierter Form vorliegt und diese Aggregate sich durch SDS nicht mehr dissoziieren lassen. Für eine Aggregation der Core-Proteine und des Cyt.b_{III} spricht auch das gelchromatographische Verhalten. Es wurde versucht, die Verunreinigungen, vor allem das Cyt.b_{III} mit Hilfe einer Chromatographie an Sepharose 6B-C1 in 0,05 % Triton, 200 mM NaCl, 10 mM Mops, 1 mM NaN₃ pH 7,2 abzutrennen. Dies war nicht möglich, denn die aufgetragene Präparation eluierte in unveränderter Zusammensetzung und in aggregierter Form am Säulenausschlußvolumen.

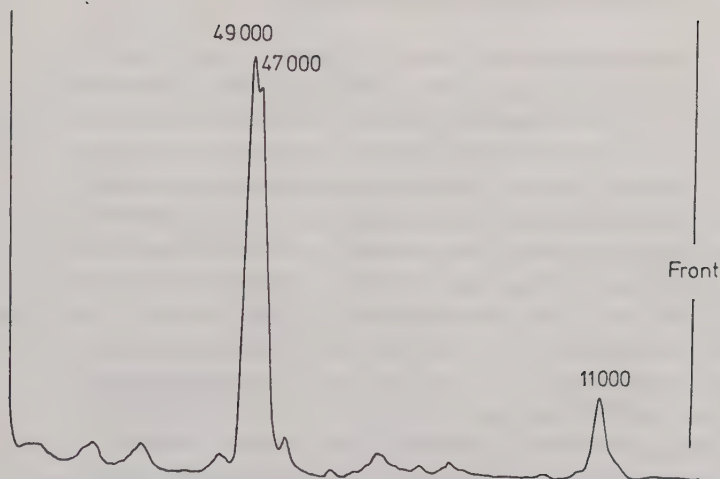


Abb.29 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Core-Protein-Präparation im Eluat der HA-II-Säule.

Neben den Core-Proteinen mit den Molekulargewichten 49 000 und 47 000 D ist als Verunreinigung das MG-11-Protein zu sehen.

Densitometrische Messung bei 546 nm nach Anfärbung mit Coomassie-Blue-G-250. (Neville u. Glossmann : 17/0,75)

3.4.3. Präparation des MG-12-Proteins

Die Verzweigung der Präparationen von Cyt.b_{III} und MG-12-Protein erfolgt erst an der Sephadex G-200-Säule in Triton (s.Präp.schema, Abb.17). Das MG-12-Protein eluiert zusammen mit den Triton-Micellen nach dem Cyt. b_{III}, woraus auf das Fehlen höherer Aggregationsstrukturen zu schließen ist. Zur Absenkung der Triton-Konzentration kann das MG-12-Protein nach Verdünnung mit dem 4-fachen Volumen des Puffers 5 mM Mops, 1 mM NaN₃ pH 7,2 an HA (Äquilibrierung mit 0,1 % Triton, 40 mM NaCl, 10 mM Mops, 1 mM NaN₃ pH 7,2) gebunden werden, wobei nicht mehr als 2 mg Protein/ml HA aufgetragen werden sollen. Die Elution wurde mit 0,5 % Triton, 250 mM NaCl, 85 mM NaPi, 1 mM NaN₃ pH 7,2 durchgeführt. Das Densitogramm der SDS-PAGE zeigt nur eine einzige Proteinbande, der ein MG von 12 000 zugeordnet werden konnte.

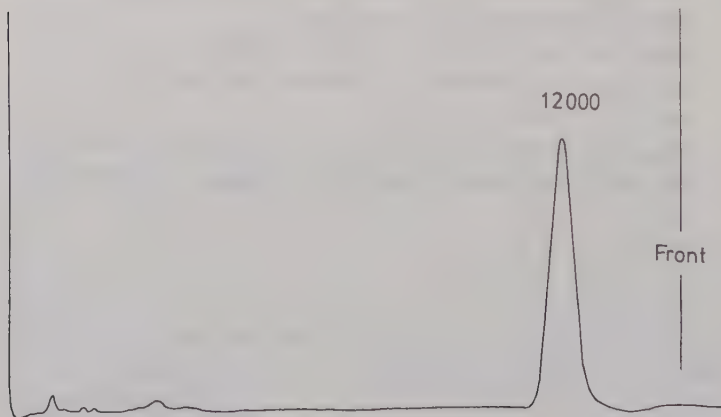


Abb.30 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des MG-12-Proteins.
(Neville und Glossmann :17 / 0,75)

3.5. Isolierung und Charakterisierung des Komplex II

Wie schon erwähnt wurde in unserem Arbeitskreis durch Modifizierung der in 3.2.1. beschriebenen Verfahren zur Präp. des K-III eine einfache und mit hoher Ausbeute arbeitende Methode gefunden, die zu einem Komplex III mit dem FeS-Protein und mit voller Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität führt (56). Einer der Gründe, die uns zur Isolierung des Komplex II (K-II) führten, war die Notwendigkeit eines geeigneten Elektronendonors für den aktiven K-III.

3.5.1. Isolationsgang

Die ersten Schritte der Präparation des K-II sind in der Übersicht über die verschiedenen K-III-Präparationen (Tab.4, Präp.4) beschrieben, da sowohl der K-II als auch der K-III aus dem gleichen Präparationsansatz isoliert werden können. Die Verzweigung der Präparationswege erfolgt bei der Chromatographie an HA. Der K-III wird an HA gebunden, während der K-II unter den vorgegebenen Bedingungen die Säule ungebinden passiert. Der Durchlauf der HA-Säule besitzt von der ersten bis zur letzten rötlich gefärbten Durchlauffraktion ein konstantes Häm b_{II} /Protein-Verhältnis von 0,4-0,5 (nMol/mg), was einer Anreicherung um den Faktor 4-5 entspricht. (20 % des Gesamt-Häm b aus Mitochondrien gehört zum Komplex II, 80 % zum Komplex III). Der Häm b-Gehalt der Mitochondrien von 0,5 nMol/mg Protein setzt sich also zusammen aus 0,1 nMol Häm b_{II} /mg Prot. und 0,4 nMol Häm b_{III} /mg Prot. Sämtliche Durchlauffraktionen (das etwa 1,5-fache des Auftragsvolumens) werden vereinigt und zur Ammoniumsulfatfällung eingesetzt. Eine Ammoniumsulfatfällung in der Triton-Lösung war erst nach Zugabe von Cholat

möglich. Zu jeweils 100 ml der Durchlauffractionen werden 4 ml Na-Cholat (20 %, pH 9,3) und tropfenweise 32 ml einer bei 4 °C gesättigten Ammoniumsulfatlösung (pH 8,1) zugegeben. Folgende Endkonzentrationen liegen dann vor : 3 % Triton, 0,6 % Na-Cholat, 24 % Ammoniumsulfat-Sättigung. Der pH-Wert liegt bei 8,1 . Der Ansatz bleibt 15 Min. im Eisbad und wird dann 10 Min. bei 20 000 g zentrifugiert. Im Sediment befindet sich annähernd quantitativ der AdN-Carrier, während mehr als 90 % des K-II im Überstand bleiben. Die Ammoniumsulfat-Konzentration in Überstand wird auf 48 % Sättigung erhöht. Die anschließende Zentrifugation bei 20 000 g (10 Min.) führt zu einem rotbraunen, oben schwimmenden Oel. Die farblose Ammoniumsulfat-Lösung wird soweit wie möglich abgesaugt. Das verbleibende rotbraune Oel wird mit etwa dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Nach Dialyse gegen 10 mM Tris pH 8 (zur vollständigen Entfernung des Ammoniumsulfats) wird 15 Min. bei 20 000 g zentrifugiert und die klare, rötliche Lösung auf eine DEAE-Sephacel-Anionenaustauschersäule aufgetragen. Pro Gramm Mitochondrien-Protein wird etwa 25 g Sephacel (Äquilibrierung mit 10 mM Tris pH 8) gebraucht. Die Säule soll aus mehreren zusammenschraubbaren Segmenten aufgebaut sein. Es wird mit einem Säulenvolumen des Puffers 10 mM Tris pH 8 nachgespült. Der K-II bindet etwa in der Mitte der Sephacel-Säule mit rötlicher Farbe, während der obere Teil der Säule weiß bleibt. Die Säulensegmente werden abgeschraubt und alle weißen Bereiche des Sephacel verworfen. Die rötlichen Sephacel-Bereiche werden entnommen und im Meßzylinder mit 200 mM NaCl, 100 mM Tris, 1 mM NaN_3 pH 8 (1 Vol. pro Vol.Sephacel) versetzt, wobei der K-II vom Säulenmaterial abgelöst wird. Nach Filtration zur Entfernung des Sephacel erfolgt eine Druckfiltration an XM-100 (Konzentrierungsfaktor 3) und eine Gelfiltration an Aca 34 (Äquilibrierung mit 0,05 % Triton, 50 mM NaCl, 20 mM NaPi, 1 mM NaN_3 pH 7,2).

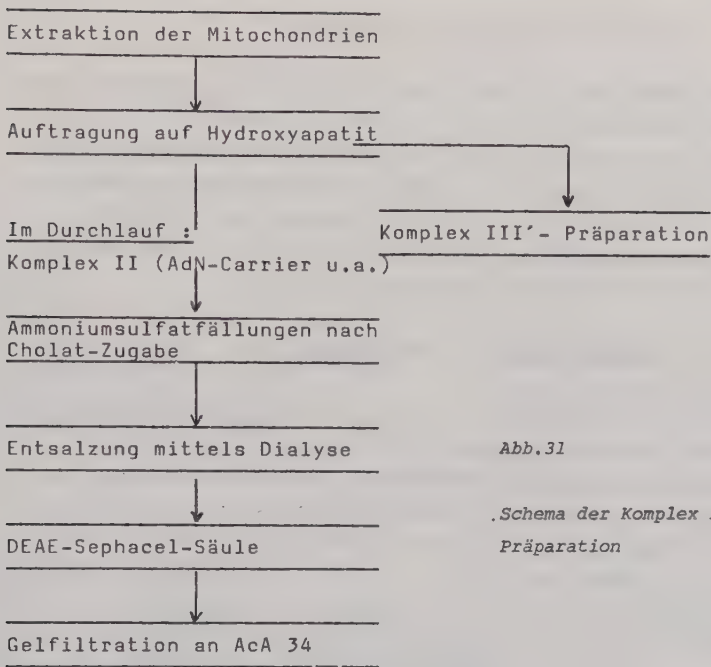


Abb.31

Schema der Komplex II-
Präparation

Fraktion	Protein (mg)	Häm b_{II} (nMol)	b_{II} /Prot. (nMol/mg)	Anreich. (fach)	Ausbeute (%)
Mitochondrien	1000	100	0,1	-	100
HA-Durchlauf	~ 110	50-80	0,4-0,5	4-5	50-80
vor Sephacel	~ 60	45-75	0,8-1,0	8-10	45-75
nach Sephacel	~ 25	25-40	1,4-1,9	14-19	25-40
nach AcA 34	~ 5	20-30	3,5-5,0	35-50	20-30

Tab.12 Anreicherung und Ausbeute der Komplex II-Präparation

3.5.2. Charakterisierung des Komplex II

Die Komplex II-Präparation nach Ziegler und Doeg (119) in der Modifikation nach Baginsky und Hatefi (120) enthält ein b-Cytochrom, das mit Succinat nicht reduzierbar ist, obwohl der Komplex eine Succinat-Ubichinon-Reduktase-Aktivität aufweist. Es blieb zu klären, ob dieses Cyt.b zum Komplex II gehört oder ob es besser als eine präparativ bedingte Verunreinigung anzusehen ist.

3.5.2.1. Zusammensetzung des Komplex II

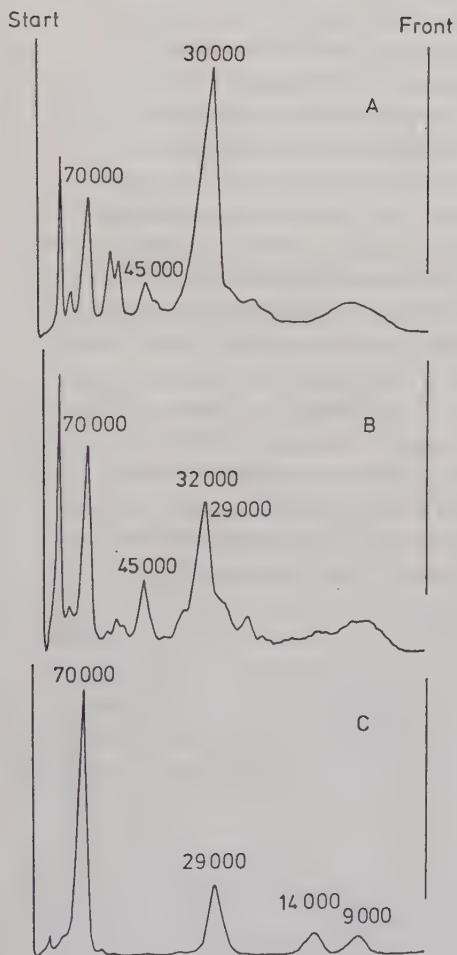
Die Zusammensetzung aus den in Tab.13 zusammengefaßten Komponenten unterscheidet sich nur geringfügig von der nach Baginsky und Hatefi erhaltenen Komplex II-Präparation. Die neue Präparation enthält jedoch Ubichinon-10, was im Zusammenhang mit dem höheren Lipidgehalt zu sehen ist.

Komponente	Konzentration / mg Protein	
	(Baginsky/Hatefi)	(Schägger)
FAD	4,6-5,0 nMol	4,4-5,0 nMol
Nicht-Häm-Eisen	36-38 nMol	36-40 nMol
Säurelabiler Schwefel	32-38 nMol	32-38 nMol
Häm b	4,5-4,8 nMol	4,4-5,0 nMol
Lipide	0,2 mg	1,0 mg
Ubichinon-10	0 nMol	1,5-2,0 nMol

Tab.13 Zusammensetzung des Komplex II

Abb.32 zeigt die Proteinzusammensetzung der Präparation bei den einzelnen Präparationsstufen. Deutlich ist in dem Densitogramm des HA-Durchlaufes (Abb.32 A) eine sehr starke Proteinbande, der ein Molekulargewicht von 30 000 zugeordnet wird, zu erkennen. Bei dieser Hauptverunreinigung des K-II handelt es sich um den AdN-Carrier.

Abb. 32



SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Komplex II bei den verschiedenen Präparationsschritten.

(A) Densitogramm des HA-Durchlaufes

(B) Densitogramm nach Ammoniumsulfatfällung u. Entsalzung

(C) Densitogramm des reinen Komplex II nach der ACA 34-Säule

Vier Proteine (70 000, 29 000, 14 000 und 9 000 D) werden zum Komplex II gerechnet.

(SDS-PAGE nach Weber und Osborn mit 13 % Acrylamid und 0,2 % Quervernetzer).

Die stärkste Proteinbande des Komplex II mit einem Molekulargewicht von 70 000 ist bereits über dem Untergrund der weiteren Verunreinigungen zu erkennen. Mit der Ammoniumsulfatfällung, die die Löslichkeitsunterschiede zwischen dem hydrophoben, integralen Membranprotein des AdN-Carriers und dem Komplex II mit seiner wasserlöslichen Succinat-Dehydrogenase-Untereinheit (70 000 und 29 000) ausnützt, kann der AdN-Carrier fast quantitativ ausgefällt werden (Abb. 32 B). Eine weitere Reinigung wird durch Sephacel und die anschließende Gelchromatographie an AcA 34 erreicht. Das zugehörige Densitogramm (Abb. 32 C) zeigt, wie von Baginsky und Hatefi beschrieben vier Proteinbanden (120). Diesen Proteinbanden wurden die Molekulargewichte 70 000, 29 000, 14 000 und 9 000 zugeordnet.

Wie bei Baginsky und Hatefi ist auch in dieser Präparation ein b-Cytochrom in einer Konzentration von 4-5 nMol/mg Protein vorhanden, das sich spektral und potentiometrisch deutlich vom Cytochrom b_{III} unterscheiden läßt. Dieses Ergebnis ist als weitere Stütze für die Zugehörigkeit des Cyt. b_{II} zum Komplex II zu werten.

3.5.2.2. Spektrale und potentiometrische Eigenschaften

Das Red.-Ox.-Differenzspektrum des K-II bei Raumtemp. (Abb.33 A) ähnelt im α -Bereich dem entsprechenden Differenzspektrum des K-III' (s. Abb.12 A). Beim K-II ist ein Absorptionsmaximum bei 560 nm mit einer Schulter zu kürzerer Wellenlänge zu beobachten, während das Absorptionsmaximum des K-III' bei 563 nm liegt. Die Schulter im Diff.spektrum des K-III' ist auf die Absorption des Cyt.c₁ zurückzuführen, das sich durch Reduktion mit Ascorbat isoliert darstellen läßt. Im K-II gibt es dagegen kein Cytochrom mit kovalent gebundener Häm-Gruppe. Die Schulter wird dem Cyt.b_{II} selbst zugeordnet. Eine Reduktion des Cyt.b_{II} kann weder mit Ascorbat, noch mit Ascorbat/TMPD erreicht werden. Auch Succinat reduziert nur etwa 3-5 % des Gesamt-Cyt.b_{II}. Weitere Absorptionsmaxima des Red.-Ox.-Differenzspektrums des K-II liegen bei 533, 526 und 424 nm (Abb.33 B). Das Flavin des K-II absorbiert im Bereich um 450 nm im oxidierten Zustand stärker als im reduzierten, weshalb ein Absorptionsminimum bei 450 nm auftritt. Die Absolut-Spektren des im K-II integrierten Cyt.b_{II} im reduzierten Zustand (Abb. 33 C, Reduktion mit Dith.) und im oxidierten Zustand (Abb.33 D), sind durch die zu kürzeren Wellenlängen ansteigende Absorption der FeS-Proteine des K-II überlagert.

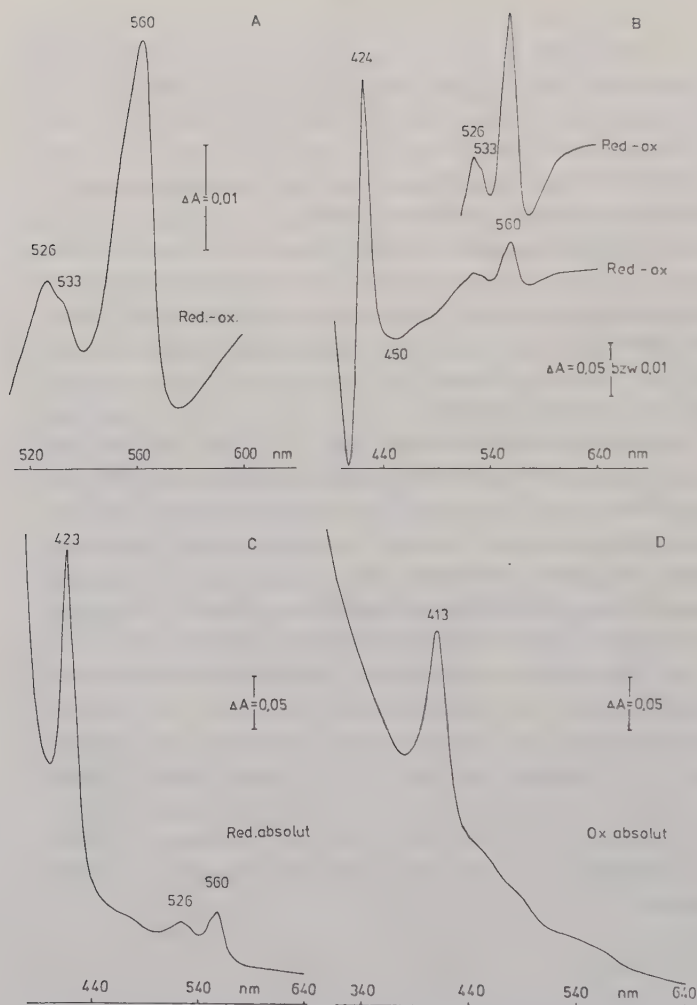


Abb.33 Lichtabsorptionsspektren des Komplex II bei Raumtemperatur.
 A) Red.-Ox.-Differenzspektrum (Reduktion mit Dithionit) im α -Bereich und B) im α , β und γ -Bereich
 C) Absolut-Spektrum des K-II im Dith.-reduzierten Zustand
 D) Absolut-Spektrum des K-II im oxidierten Zustand

3.5.2.3. Elektronentransportaktivität und Stabilität

Im Gegensatz zu Präparationen der löslichen Succinat-Dehydrogenase, die zwar noch Elektronentransport-Aktivitäten mit artifiziellen Elektronenacceptoren wie Phenazinmethosulfat oder Ferricyanid aufweisen, besitzt der Cytochrom b-enthaltende Komplex II noch die Fähigkeit, das Ubichinon der mitochondrialen Membran zu reduzieren. Da sich die Reduktion des Ubichinon schlecht direkt messen läßt wird allgemein die Reduktion des Farbstoffes DCIP gemessen. Das DCIP reagiert selbst nicht mit dem K-II. Der verwendete, im methodischen Teil beschriebene Testansatz ist mit dem in der Literatur beschriebenen Standard-Test bis auf die Verwendung von Ubichinon-1 anstelle von Ubichinon-2 identisch. Unter diesen Standardbedingungen wurden Succinat-DCIP-Reduktase-Aktivitäten von 45 $\mu\text{Mol/Min.mg}$ Protein, verglichen mit 50-55 $\mu\text{Mol/Min.mg}$ für den nach Baginsky und Hatefi präparierten K-II gemessen.

Der K-II ist in Lösung bei 4 °C nur begrenzt stabil. Bereits nach wenigen Tagen sinkt zuerst die enzymatische Aktivität drastisch ab, der mit Verzögerung der Verlust der Cyt.b_{II}-Absorption folgt. Wird die Lösung jedoch 1:1 mit Glycerin gemischt und bei -20 °C aufbewahrt, so ist der K-II über Monate spektral und enzymatisch stabil.

4. DISKUSSION

4.1. Wechselwirkung von Proteinen mit Hydroxyapatit

Calciumphosphat wurde bereits 1861 von Brücke (121) zur Trennung von wasserlöslichen Proteinen eingesetzt. Eine Vielzahl von Proteintrennungen im Batch-Verfahren oder über Säulenchromatographie folgten (67,68,122). Durch Verwendung des anionischen Detergens SDS wurde der Anwendungsbereich erweitert, so daß auch nicht wasserlösliche Proteine chromatographiert werden konnten (123).

Mit Hilfe der Kombination des schonenden, nichtionischen Detergens Triton und des HA konnten auch Präparationen von Membranproteinen in funktionell aktivem Zustand erreicht werden (116,124).

Die Wechselwirkung (WW) von Proteinen mit HA wird nach Bernardi (68) differenziert in die WW negativ geladener funktioneller Gruppen der Proteine mit dem Ca-Gitter des HA-Gerüsts und in die WW positiv geladener funktioneller Gruppen mit dem HA (vermutlich mit den Phosphat-Gruppen des HA). Die WW mit dem Ca-Gitter sind stark durch die Einwirkung von Ionen mit starker Affinität zum Ca, wie z.B. Phosphat, Citrat oder Sulfat, aber kaum durch Veränderung der Ionenstärke beeinflussbar, während die WW mit den Phosphat-Gruppen durch die Ionenstärke in den Pufferlösungen leicht verändert werden kann. Auf diese Weise ist die Elution von Proteinen durch zwei Parameter regulierbar, die eine differenzierte Elution von Proteinen erlauben. Als Beispiel soll die unterschiedliche Reihenfolge der Elution des Cytochrom c und des K-III'dienen. Cyt. c mit einem IP bei pH 10 sollte bei einem pH von 7,2 stark mit den Phosphat-Gruppen in WW treten, während der K-III' mit seinem IP bei pH 5,3 (144) stark mit dem Ca-Gitter in

Wechselwirkung treten sollte. Die Elution des Cyt.c sollte infolgedessen stark von der Ionenstärke, die Elution des K-III' hingegen stark von der verwendeten Phosphat-Konzentration abhängen. Dies wird auch tatsächlich beobachtet. Im Falle der K-III'-Präp.1 (Tab.4) wird im ersten Elutionspuffer eine Phosphat-Konzentration von 110 mM und eine NaCl-Konzentration von 90 mM verwendet. Dieser Puffer eluiert weder Cyt.c noch den K-III'; da sowohl die Ionenstärke für Cyt.c, als auch die Phosphat-Konzentration für den K-III' zu niedrig ist. Mit dem Elutionspuffer 3, der 8 mM Citrat enthält wird dann zwar der K-III'; nicht aber Cyt.c eluiert. Anders liegen die Verhältnisse bei der Präp.2 (Tab.4). Hier wurde im ersten Elutionspuffer die Phosphat-Konzentration auf 85 mM gesenkt, während die NaCl-Konzentration auf 250 mM erhöht wurde. Bei dieser erhöhten Ionenstärke eluiert nur das Cyt.c, nicht aber der K-III'.

Ein dritter Parameter, der die Elution von mitochondrialen Membranproteinen beeinflusst, ist die verwendete Detergens-Konzentration. Es ist z.B. möglich, die Triton-Konzentration im ersten Puffer bei gleichbleibenden Konzentrationen von 250 mM NaCl und 85 mM NaPi auf 0,05 % zu senken, was wegen Detergensmangel zur Bindung fast sämtlicher aufgetragener Proteine führt. Wird anschließend der Elutionspuffer 3 der Präp.2 (0,05 % Triton, 150 mM NaPi pH 7,2) angewandt, so eluieren nur die Proteine, die bereits bei dieser niedrigen Triton-Konzentration in Lösung gebracht werden können, unter anderem auch der K-III'. Der K-IV dagegen, der unter den Bedingungen der Präpp.1,2 und 3 deutlich vor dem K-III' eluierte, kann erst anschließend mit höheren Triton-Konzentrationen eluiert werden. Möglicherweise sind diese höheren Triton-Konzentrationen notwendig, um Aggregationen des K-IV wieder aufzulösen bzw. um die Entstehung von Membranfragmenten zu verhindern.

Nur in einem einzigen Fall spielte die Konzentration der auf die HA-Säule aufgetragenen Proteinelösung eine Rolle, nämlich im Fall der K-II-Präparation. Wird bei einer niedrigen Protein-Konzentration aufgetragen, so bindet der K-II bei den gegebenen Bedingungen an HA, während er bei hohen Protein-Konzentrationen (20-30 mg/ml) die HA-Säule ungebunden passiert. Die Ursache dafür ist möglicherweise in einer besseren Abschirmung des K-II gegen die Bindungsstellen des HA durch die höhere Konzentration an Triton-Phospholipid-Micellen zu suchen.

4.2. Isolierung und Charakterisierung des Komplex III'

Erst die Verwendung von Detergentien erlaubte die effektive Isolierung von Membranproteinen wie z.B. die Isolierung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe in Cholat- oder Desoxycholat-Lösungen. Bei vielen anderen Membranprotein-Präparationen erwies sich Triton als eines der für Proteine schonendsten Detergentien und wie z.B. am AdN-Carrier gezeigt wurde, als schonenderes Detergens als Cholat (125). Trotzdem scheint Triton auf den ersten Blick wesentlich aggressiver als die Salze der Gallensäuren zu sein, wenn man nur die Wirkung auf die Proteine der Atmungskette, insbesondere auf die Cytochrome betrachtet. Die Ursache für diese Diskrepanz ist darin zu sehen, daß Triton bei der Chromatographie an Säulen in der Lage ist, den schützenden Lipidmantel der Proteine abzulösen. In diesem Fall ist das Protein also dem Angriff des Detergens unmittelbar ausgesetzt, während bei den Ammoniumsulfat- und Ammoniumacetat-Fällungen aus Cholat- bzw. Desoxycholat-Lösungen die Protein-umhüllende Lipidschicht weitgehend erhalten bleibt.

Die neue Präparationsmethode des K-III' zeichnet sich im Vergleich mit anderen Präparationsmethoden (45,103-105,126) durch ihre Einfachheit und ihre sehr hohe Ausbeute und Reinheit aus. Als wesentlichste Unterschiede sind das Fehlen von Phospholipiden, das Fehlen des FeS-Proteins und die Notwendigkeit der Verwendung von Antimycin (als Folge des direkten Angriffs des Detergens bei Verwendung chromatographischer Methoden) anzusehen. Alle drei Faktoren können, jeder für sich betrachtet, das Fehlen der Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität erklären. Nachdem das Hauptziel dieser Präparation nicht enzymatische Studien am Komplex III selbst sein sollten, sondern diese Präparation hauptsächlich als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Protein-Untereinheiten verwendet werden sollte, war das Fehlen des FeS-Proteins als sein größter Nachteil anzusehen.

Infolge des Fehlens der Ubichinon-Cyt.c-Reduktase-Aktivität konnte zur Prüfung der "Nativität" des isolierten K-III' nur die Messung der Redoxpotentiale und der Reaktivität gegenüber CO herangezogen werden (112). Sowohl die nur geringfügig veränderten Mittelpotentiale des Cyt.b_{III} bzw. das unveränderte Mittelpotential des Cyt.c_I als auch das Fehlen einer CO-Reaktivität entsprechen den Eigenschaften der übrigen, enzymatisch aktiven Komplex III-Präparationen. Für das Studium der hydrodynamischen Eigenschaften erwies sich die K-III'-Präparation als ideal, da hier keine Aggregationen wie bei den Präparationen in Cholat/Desoxycholat auftraten.

Die Annahme der Existenz der Atmungskettenkomplexe konnte im Fall der Komplexe II und III' durch weitere experimentelle Befunde gestützt werden. Die hier vorgestellten, nach völlig anderen Trennprinzipien arbeitenden Präparationsmethoden führten wieder zu Multiproteinkomplexen mit den bekannten Proteinzusammensetzungen (allerdings mit Ausnahme des FeS-Proteins des K-III),

so daß die Annahme von Co-Präzipitationen in den früheren K-III-Präparationen als unwahrscheinlich angesehen werden darf. Da die K-III'-Präparation aus den oben genannten Gründen keine UQ-Cyt.c-Reduktase-Aktivität mehr zeigen kann, konnte somit auch nicht gezeigt werden, ob das fehlende FeS-Protein eine notwendige Komponente des Komplex III ist.

Die zweite den K-III betreffende Frage war die Frage nach seinem Aggregationszustand. Das Molekulargewicht des nach Hatefi et al. (45) präparierten Komplex III wurde 1965 mittels Lichtstreuungs- und Ultrazentrifugations-Studien bestimmt (127). Bei diesen Untersuchungen war der Komplex durch Taurocholat bzw. Taurodesoxycholat in Lösung gehalten worden. Homogene Schlieren-Banden zeigten eine in sich einheitliche Präparation an, die mit einem Sedimentationskoeffizienten von $s_{20,w}=10,2$ (S) sedimentierte. Die Menge des gebundenen Detergens wurde zwar nicht gemessen, jedoch wurde ohne Korrekturen und unter der Annahme eines sphärischen Moleküls ein Molekulargewicht von 250 000 abgeschätzt. Auf Grund dieser Messung wurde angenommen, daß der Komplex III als Monomer vorliegt. (Die Summe der mit der SDS-PAGE ermittelten Molekulargewichte der Untereinheiten liegt bei 200 000-250 000)

Die mit verfeinerten Methoden am K-III' in Triton durchgeführten UZ-Studien (86) zeigten jedoch eindeutig die Existenz eines dimeren K-III' an. Aus diesem Grund wurde der Dimer als die funktionelle Einheit in der Mitochondrienmembran vorgeschlagen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch vom Komplex IV berichtet. K-IV wurde in Cholat-Präparationen als Monomer (128), in Triton hingegen als Dimer isoliert (129-132). Gegen die Annahme eines artifiziellen Dimers spricht im Fall des K-III' die Tatsache, daß der Dimer auch bei Erhöhung der Salzkonzentration bis zu 1 M NaCl erhalten bleibt.

Eine weitere Erhöhung der NaCl-Konzentration führt bereits zu einer teilweisen Spaltung des K-III' in die einzelnen Protein-Untereinheiten. Eine K-III-Präparation aus *Neurospora Crassa* (126) in Triton, die mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an einer mit Cyt.c beladenen Sepharose 4 B-Säule erhalten wird, tritt ebenfalls in dimerem Zustand auf. Elektronenbeugungsuntersuchungen an den nach Phospholipidzugabe erhaltenen zweidimensional geordneten Strukturen zeigen deutlich eine aus K-III-Dimeren aufgebaute Anordnung (133).

4.3. Isolierung und Charakterisierung des Cyt.b aus dem Komplex III'

Das ursprünglich als Nachteil des K-III' gegenüber anderen K-III-Präparationen erscheinende Fehlen des FeS-Proteins erwies sich hinsichtlich der Cyt.b-Präp. als großer Vorteil. Wie die Versuche von W.D.Engel zur Isolierung des FeS-Proteins aus dem das FeS-Protein enthaltenden K-III zeigten, verläuft die Auftrennung der Protein-Untereinheiten analog zu der in dieser Arbeit beschriebenen mit der Ausnahme, daß das FeS-Protein zusammen mit dem Cyt.b eluiert wird. Die Trennung dieser beiden Komponenten konnte trotz intensiver Bemühungen noch nicht erreicht werden.

Das Konzept der Cyt.b_{III}-Präparation war eine möglichst schonende Spaltung des sehr schwer in seine Untereinheiten spaltbaren K-III' und die Vermeidung jeder Methode, die eine Ausfällung oder Aggregation der Proteine erfordert. Die erste Forderung war unumgänglich, da eigene Erfahrung bei den K-III-Präparationsversuchen ohne Antimycin zeigte, wie leicht das Cyt.b unter Verlust des Häm-Signals denaturiert. Es wurde außerdem eine Stabilisierung des Cyt.b durch das am K-III' gebundene

Antimycin erhofft, da das Cyt.b als wahrscheinlichster Kandidat für die Antimycin-Bindung gilt (104,48,134, 135) und bei schonender Spaltung des Komplexes eventuell eine Abspaltung des Ant. vermieden werden könnte.

Die Vermeidung von Fällungen und Aggregationen erschien notwendig, da die Beispiele der Cyt.b_{III}-Literatur zeigen, daß das einmal ausgefällte Membranprotein nur noch durch stark denaturierende ionische Detergentien wieder in Lösung gebracht werden kann (59-63). Eigene Versuche an reinem, mit Hilfe von Trichloressigsäure, Aceton oder Glycerin ausgefälltem Cyt.b_{III} zeigten, daß nicht einmal SDS in einer Konzentration von 5 % in der Lage ist, die aggregierten Proteinmoleküle vollkommen voneinander zu trennen. Die Inkubation des Proteins mit SDS und Mercaptoethanol bei Temperaturen über 30 °C erhöht den Anteil der nicht mehr auftrennbaren Aggregate. Ähnliche Schwierigkeiten bezüglich der Löslichkeit sind auch vom AdN-Carrier bekannt (136). Dieses ungewöhnliche Löslichkeitsverhalten scheint speziell bei den sehr hydrophoben, integralen Membranproteinen anzutreffen zu sein. Zur Protein-Sequenzierung mußte das in SDS vorliegende Cyt.b-Apoprotein jedoch mit Trichloressigsäure ausgefällt werden. Es konnte dann nur noch mit 80-prozentiger Ameisensäure in Lösung gebracht werden.

Zur Spaltung des Komplexes in seine Untereinheiten mußte wohl oder übel für kurze Zeit Guanidin in einer Konzentration von 1,5 M verwendet werden. Die Spaltungsversuche von Rieske et al. (127,137) am nach Rieske u. Hatefi präparierten K-III zeigten, daß eine Spaltung des

Komplex III ohne gebundenes Antimycin eine Konzentration von 1 M Guanidin erforderte, während sich der K-III mit gebundenem Ant. als stabiler erwies und eine Konzentration von 3 M Guanidin benötigte. Überraschenderweise ließ sich der K-III' jedoch trotz des gebundenen Antimycins bereits durch Guanidin-Konzentrationen ab 1 M spalten. Um eine rasche Spaltung auf der HA-Säule und damit eine konzentriertere Protein-Elution zu gewährleisten wurde die Guanidin-Konzentration auf 1,5 M erhöht. Nach Austausch der hohen Guanidin-Konzentration gegen ein Medium geringer Ionenstärke mittels einer Chromatographie an Sephadex G-25 konnten überraschenderweise 90 % des Häm-tragenden Cyt.b wiedergefunden werden, so daß dieser Guanidin-Schritt nur zu einem Verlust von maximal 10 % des Häms führte. Diese unerwartete Stabilität wurde zunächst einer möglichen Stabilisierung durch gebundenes Antimycin zugeschrieben. Wie die unter 3.3.2.4. beschriebenen Experimente jedoch zeigten, war das Ant. nach der Spaltung weder ans Cyt.b_{III} noch an eine andere Untereinheit gebunden.

Die zweite Forderung der Vermeidung von Proteinfällenden oder -aggregierenden Bedingungen konnte weitgehend durch Verwendung hoher Triton-Konzentrationen erfüllt werden. Trotz dieser hohen Triton-Konzentrationen treten jedoch bei der Abtrennung der Core-Proteine auf der zweiten HA-Säule (möglicherweise infolge der notwendigen Reduzierung der Ionenstärke) Cyt.b-Verluste in Höhe von 30-40 % auf. Wie die Gelchromatographie an Sepharose 6B-C1 zeigt, bildet dieser Anteil des Cyt.b zusammen mit den Core-Proteinen Aggregate aus.

Obwohl eine Fülle experimenteller Daten über das im Komplex III integrierte Cyt.b vorliegt (138,28)

und auch erhebliche Anstrengungen gemacht wurden, über die Isolierung der Cyt.b-Untereinheit weitere Aussagen zur Arbeitsweise des Komplex III und des Cyt.b_{III} zu erhalten, blieb die Funktion des Cyt.b offen. Möglicherweise blieben die Studien zur Funktion des Cyt.b an den gereinigten Cyt.b-Präparationen schon allein wegen der zu drastischen Präparationsbedingungen unergiebig.

Wegen der präparativen Bedingungen, die zum Teil die Verwendung von Proteasen notwendig machten, bzw. wegen der nicht rein erhaltenen Cyt.b_{III}-Präparationen und des leichten Häm-Verlustes herrschte Uneinigkeit bezüglich des Molekulargewichtes des Cyt.b_{III}. Anhand der neuen Präparation konnte nachgewiesen werden, daß dem durch SDS monomerisierten Cyt.b in der SDS-PAGE (nach Neville und Glossmann, mit 17 % Acrylamid und 0,75 % Quervernetzer) nur eine einzige Proteinbande mit einem MG von 31 000 zuzuordnen ist. Eine Zuordnung des MG von 32 000 für das Cyt.b_{III} aus *Neurospora Crassa* mittels SDS-PAGE war bereits 1974 von H.Weiss (64) beschrieben worden. Trotzdem kann mittels SDS-PAGE allein keine eindeutige Molekulargewichtszuordnung erreicht werden, da wie Marres und Slater (47) zeigten, eine starke Abhängigkeit des scheinbaren Molekulargewichts von der Polyacrylamid-Konzentration der Gele zu beobachten ist und außerdem die Möglichkeit besteht, daß das Cyt.b als sehr hydrophobes Membranprotein mehr SDS bindet als die verwendeten Eichproteine. Bei Extrapolation auf 0 % Polyacrylamid-Konzentration bestimmten Marres und Slater für das in SDS denaturierte Protein ein MG von 55 000. Molekulargewichtsbestimmungen derselben Arbeitsgruppe mittels Gelfiltration ergaben jedoch ein scheinbares Molekulargewicht von 30 000.

Die neue Cyt.b_{III}-Präparation aus Rinderherz und die Cyt.b-Präparation von H.Weiss aus *Neurospora Crassa* sind die einzigen Cyt.b-Präparationen, die zu einem homogen gelösten Häm-tragenden Protein führen. Aus diesem Grund konnten mit diesen Präparationen nicht nur Molekularge-

wichtsbestimmungen mit dem denaturierten, sondern auch mit dem Häm-tragenden Protein durchgeführt werden.

Aus Sedimentations-Gleichgewichtsläufen in der analytischen Ultrazentrifuge und der Messung der Triton-Bindung wurde für das Häm-tragende Protein ein MG von 62 000 bestimmt (51). Nachdem über die Bestimmung des Häms mit der Pyridinhämochromogenmethode und über die Bestimmung des Proteins nach der Lowry-Methode (Häm/Protein : 30 nMol/mg) ein minimales Molekulargewicht von 33 000 errechnet wurde, wurde in Übereinstimmung mit H.Weiss das Vorliegen eines Cyt.b-Dimers angenommen. H.Weiss (64) postulierte bereits 1974 den Cyt.b-Dimer, nachdem über UZ-Studien ein MG von 51 000 für das Häm-tragende Cyt.b aus *Neurospora Crassa* (bei einem minimalen Molekulargewicht von 25 000-30 000) berechnet worden war.

Aufgrund neuerer Untersuchungen (s.3.3.2) an Cyt.b_{III}-Präparationen mit einem höheren Häm-Gehalt (Häm/Protein: 42 nMol/mg) mußte das ursprünglich von mir bestimmte Molekulargewicht zu 55 000 D korrigiert werden. Das minimale Molekulargewicht wurde aus dem Häm/Protein-Verhältnis von 42 nMol/mg zu 23 800 neu berechnet. Diese Korrekturen änderten jedoch nichts an der Annahme eines Cytochrom b-Dimers.

Neueste Arbeiten auf dem Gebiet der Genetik (139-141) gaben jedoch den Anstoß, die Ergebnisse noch einmal kritisch zu betrachten. Einer persönlichen Mitteilung von B.G.Barrell zufolge liegt die DNA-Sequenz des Cyt.b_{III} aus Rinderherzmitochondrien vor. Danach besitzt das Cyt.b (ohne Häm) ein Molekulargewicht von 42 500. Demzufolge hätte über die Ultrazentrifugationsstudien entweder ein MG von 43 700 für ein einziges Cyt.b-Protein mit zwei Häm-Zentren oder aber ein MG von 86 200 für einen Cyt.b-Dimer mit je einem Häm pro Untereinheit festgestellt werden müssen.

Obwohl das über UZ-Studien bestimmte Molekulargewicht von 55 000 mit keiner der beiden Möglichkeiten exakt übereinstimmt erscheint es mir aus folgenden Gründen notwendig, das Cytochrom b_{III} als ein Protein mit zwei Häm-Zentren zu betrachten.

1) Aus acht Sedimentations-Gleichgewichtsläufen wurde ein unkorrigiertes Molekulargewicht (keine Berücksichtigung der Triton-Bindung) von $85\,200 \pm 3\,000$ bestimmt. Würde ein Cyt.b-Dimer mit einem MG von 86 200 vorliegen, dürfte also kein Triton an das Cyt.b $_{III}$ -Protein gebunden sein, was in krassem Widerspruch zu den Experimenten steht. Liegt andererseits ein Protein mit zwei Häm-Zentren vor, müßte (falls keine anderen Moleküle als Triton an das Protein gebunden sind) eine Triton-Bindung von 3 g/g Protein gefordert werden. Die Abweichung vom experimentell bestimmten Wert (1,9 g Triton / g Protein) ist zwar ebenfalls erheblich, möglicherweise ist sie jedoch darauf zurückzuführen, daß die Messung der Triton-Bindung unter anderen Bedingungen durchgeführt wurde als die Sedimentations-Gleichgewichtsläufe. (Die Triton-Bindung wurde bei 4 °C und Triton-Konzentrationen von nur 0,06 bis 0,1 % gemessen, um die Differenz zwischen Protein-gebundenem ^3H -Triton und dem ^3H -Triton des Äquilibrierungspuffers gut messen zu können, während die UZ-Läufe bei Raumtemperatur und 0,5 % Triton durchgeführt wurden ; bei Sedimentations-Gleichgewichtsläufen mit den niedrigeren Triton-Konzentrationen traten Aggregationen auf .)

2) Von H. Weiss (145) wurde über Sedimentations-Gleichgewichtsläufe für das in Desoxycholat vorliegende Prot. aus *Neurospora Crassa* ein unkorrigiertes Molekulargewicht von 62 000 bzw. ein für die Desoxycholat-Bindung korrigiertes MG von 51 000 bestimmt. Da die Detergens-Bindung in Desoxycholat mit 0,3 g / g Protein wesentlich niedriger ist als bei Verwendung von Triton, dürfte eine durch

Fehler in der Detergens-Bindung verursachte Abweichung vom tatsächlichen Molekulargewicht niedriger sein.
3) Das minimale Molekulargewicht wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen nach verschiedenen Methoden bestimmt (58,60,64). Es liegt in allen Fällen zwischen 20 000 und 30 000 D pro Häm. Bei gleichzeitiger Berücksichtigung des aus der DNA-Sequenz bestimmten MG von 42 500 (ohne Häm) bzw. 43 700 (mit zwei Häm-Zentren) liegt die Annahme eines einzigen Proteins mit zwei Häm-Zentren nahe.

Die Präparation des Cyt.b_{III} zeigt zwar im Gegensatz zur Situation im K-III' sowohl bei Raumtemperatur als auch bei -196 °C nur noch ein Spektrum, in dem beide Häm-Zentren ununterscheidbar sind, jedoch wird durch Redoxpotentialmessungen eine Differenzierung beider Häm-Zentren möglich. Während die Cyt.b-Präp. von H. Weiss nur ein einziges Mittelpotential von -56 mV aufweist, kann hier festgestellt werden, daß zwei Komponenten mit Mittelpotentialen von -5 und -85 mV (bei pH 7) zu gleichen Teilen zu den Absorptionsveränderungen beitragen.

Der Versuch, die Antimycin-Bindungsstelle am Komplex III zu lokalisieren scheiterte daran, daß keine der aus dem K-III' abgespaltenen Proteine in der Lage war, Ant. zu binden. Nur ein Protein, nämlich das fehlende FeS-Protein konnte als Ant.-bindendes Protein ausgeschlossen werden, weil der K-III' auch ohne dieses Protein das Ant. in der bekannten Stöchiometrie (1 Mol Ant./ 1 Mol K-III') bindet. Dieses Ergebnis bestätigt die Arbeiten von Rieske et al. (127,137). Als Erklärung könnte man annehmen, daß das Antimycin-bindende Protein durch die Guanidinspaltung stark geschädigt wurde. Als zweite Möglichkeit könnte man in Betracht ziehen, daß das Ant. zur Bindung zwei oder mehrere benachbarte Proteine benötigt und wie in einer Tasche zwischen den Proteinen sitzt.

4.3. Isolierung und Charakterisierung des Komplex II

Rieske (143) warnte vor der Verwendung chromatographischer Methoden zur Isolierung des Komplex III, weil das Enzym schnell durch Adsorption an Oberflächen inaktiviert werden soll. Die eigene präparative Erfahrung sowohl mit Komplex III als auch mit Komplex II zeigte, daß diese Warnung zu beachten ist , wenngleich der wirkliche Grund der Inaktivierung wohl in einem Verlust der schützenden Lipidhülle als Folge der Chromatographie in Detergenslösung zu sehen ist. Aus diesem Grund wurden im Fall der K-II-Präparation nur Reinigungsschritte angewandt, die keine drastische Verringerung des Lipid/Protein-Verhältnisses bewirkten.

Der erste Schritt der K-II-Präp., die Chromatographie an HA, wurde z.B. unter Bedingungen durchgeführt, die weder eine Bindung des K-II noch der Hauptmenge des mitochondrialen Phospholipids an HA erlaubt. Der denaturierende Effekt des gleichzeitig in Form von Triton-Lipid-Micellen ungehindert die HA-Säule passierenden Triton (in einer Konzentration von bis zu 5 %) ist durch die Anwesenheit des Phospholipids weitgehend zurückgedrängt. Wird der K-II dagegen an HA gebunden und durch Triton-haltige Pufferlösungen delipidiert, so ist eine vollständige Zerstörung der Cyt.b_{II}-Absorption und der Succinat-DCIP-Reduktase-Aktivität festzustellen. Auch der folgende Anreicherungsschritt entfernt die Lipide nicht vom K-II. Das Lipid/Detergens-Verhältnis wird zwar durch die Zugabe von Cholat abgesenkt und damit ungünstiger, jedoch erscheint die Cholat-Zugabe notwendig um eine Ammoniumsulfatfällung in Gegenwart von Triton durchführen zu können und um den K-II über gebundenes Cholat an den folgenden Anionenaustauscher binden zu können. Das gleiche Problem der Delipidierung taucht bei der Chromatographie am Sephacel-Anionenaustauscher

wieder auf, weshalb hier mit einer Triton-freien Lösung gespült wird. Erst nach der Reduzierung der Lipid- und Triton-Mengen erlaubt die Viskosität der Lösung eine Konzentrierung mittels Druckfiltration und eine abschließende Gelfiltration (Ultrogel AcA 34), die den Überschuß an nicht gebundenem Lipid und Triton abtrennt, ohne die notwendigen, gebundenen Lipide abzulösen.

Die neue, nach anderen Trennprinzipien arbeitende K-II-Präparationsmethode führt wie die nach Baginsky u. Hatefi (120) zu einem Komplex, dem vier Proteine zugeordnet werden und der ein von Cyt.b_{III} unterscheidbares Cyt.b_{II} enthält. Die K-II-Präp. von H.Weiss (126) aus *Neurospora Crassa* bestätigt zwar ebenfalls die Existenz eines zum K-II gehörigen b-Typ-Cytochromes, besteht jedoch nur aus drei Proteinen mit Molekulargewichten von 72 000, 28 000 und 14 000.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden neue Präparationsmethoden für die Komplexe II und III' und für die Cytochrom b-Untereinheit des Komplex III' entwickelt, die sich durch ihre Einfachheit und ihre hohen Ausbeuten auszeichnen.

Die Komplex III'-Präparation unterscheidet sich von früheren Komplex III-Präparationen durch das Fehlen des Rieske Eisen-Schwefel-Proteins, das Fehlen von Phospholipiden und durch die zur Stabilisierung des Komplexes notwendige Bindung von Antimycin. Sie besitzt zwar keine Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität, jedoch erwies sie sich wegen des Fehlens von Phospholipiden und wegen ihres homogen gelösten Zustandes als sehr gut geeignet für hydrodynamische Studien.

Durch die Kombination von Ultrazentrifugationsstudien und Messungen der Triton-Bindung konnte gezeigt werden, daß die Komplex III'-Präparation in dimerem Zustand vorliegt. Der dimere Zustand des Komplex III' lieferte den ersten Hinweis für die Existenz eines dimeren Komplex III in der Mitochondrienmembran.

Das Fehlen des Rieske Eisen-Schwefel-Proteins erleichterte die Präparation der Cytochrom b-Untereinheit des Komplex III. Die Methode zur Isolierung des Cytochrom b_{III} ist die bisher einzige Methode, die unter schonenden Bedingungen arbeitet, daß zwei Mittelpotentialle wie im intakten Komplex III gemessen werden können.

Aus Ultrazentrifugationsstudien am Cytochrom b_{III} und aus dem von B.G. Barrell aus der DNA-Sequenz errechneten Molekulargewicht wird gefolgert, daß das Cytochrom b_{III} nicht wie bisher angenommen als Dimer aus zwei b-Cytochromen, sondern als ein einziges Protein mit zwei Häm-Zentren anzusehen ist.

6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Mops	Morpholino-propansulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P _i	anorganisches Phosphat
DCIP	Dichlorphenol-indophenol
TMPD	Tetramethyl-phenylendiamin
Fecy	Ferricyanid
Triton	Triton X-100
HA	Hydroxyapatit
UZ	Ultrazentrifugation
SV	Säulenvolumen
Ant.	Antimycin A
K-III'	Komplex III ohne FeS-Protein, mit gebundenem Antimycin
K-III	Komplex III mit FeS-Protein, ohne Antimycin
MG-12-Protein	Protein mit einem Molekulargewicht von 12 000 D
MG	Molekulargewicht
Cyt.b _{III}	Cytochrom b des Komplex III
Häm b _{III}	Häm, das dem Cytochrom b _{III} zuzuordnen ist
AdN-Carrier	Adeninnukleotid-Translokator
Cyt.b _{II}	Cytochrom b aus dem Komplex II
b/P bzw. c ₁ /P	Quotient aus der zu den Cytochromen b bzw. c ₁ gehörigen Häm-Konz. u. der Protein-Konz.
P/HA	Quotient aus der Menge des auf HA aufgetragenen Proteins (mg) und dem HA-Volumen (ml)
Absolut-Spektrum	Die Probe in der Meßküvette wird gegen den zur Lösung der Probe verwendeten Puffer gemessen.
Red.-Ox.-Differenz-Spektrum	Die reduzierte Probe in der Meßküvette wird gegen die oxidierte Probe in der Referenzküvette gemessen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Von Jagow, G. und Engel, W.D. (1980) Angewandte Chemie, im Druck
2. Lee, C.P. in Methods in Enzymology (1979) Vol. LV, 104-112
3. Hatefi, Y. and Galante, Y.M. in Energy Conservation in Biological Membranes (Schäfer, G. and Klingenberg, M., eds.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York
4. Kröger, A. and Klingenberg, M. (1970) Vitamins and Hormones 28, 533-574
5. Vanderkooi, J. and Erecinska, M. (1976) in Methods of Biological Membranes, Vol. 4 (A. Martonosi, ed.) 43-86, John Wiley and Sons
6. Tzagoloff, A., Byington, K.H. and MacLennan, D.H. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2405-2412
7. Stigall, D.L., Galante, Y.M., Hatefi, Y.: J. Biol. Chem. 253, 956-964 (1978)
8. Berden, J.A. and Voorn-Brouwer, M.M. (1978) Biochem. Biophys. Acta 501, 424-439
9. Boyer, P.D. et al.: Ann. Rev. Biochem. 46, 955 (1977)
10. Von Jagow, G., Naturwissenschaften 66, 539-546 (1979)
11. Slater, E.C.: Nature 172, 975 (1953)
12. Boyer, P.D., in Oxidases and Related Redox Systems Vol. 2, 994 (T. E. King et al., eds.) New York, Wiley (1965)
13. Boyer, P.D., Cross, R.L., Mommensen, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2837, (1973)
14. Mitchell, P.: Nature 191, 144 (1961)
15. Mitchell, P.: FEBS Lett. 78, 1 (1977)
16. Hatefi, Y., Stigall, D.L.: The Enzymes (Boyer, P.D. ed.) New York
17. Hatefi, Y., Galante, Y.M., Stigall, D.L., Ragan, C.J. in: Methods in Enzymology (Fleischer, S., Packer, L. eds.) New York, Academic Press, in press

18. Capaldi, R.A., Sweetland, J., Merli, A.: *Biochemistry* 16, 5707-5710 (1977)
19. Davis, K.A., Hatefi, Y.: *Biochemistry* 10, 2509-2516 (1971)
20. Hanstein, W.G., Davis, K.A., Ghalambor, M.A., Hatefi, Y.: *Biochemistry* 10, 2517-2524 (1971)
21. Yu, C.A., Yu, L. and King, T.E. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 78, 259-265
22. Yu, C.A., Yu, L. and King, T.E. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 79, 939-946
23. Yu, C.A., Najaoka, L., Yu, L. and King, T.E. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 82, 1070-1078
24. Salerno, J.C., Harmon, H.J., Blum, H., Leigh, J.S. and Ohnishi, T. (1977) *FEBS Lett.* 82, 179-182
25. Hatefi, Y. and Galante, Y.M. (1980) *J. Biol. Chem.* in press
26. Ackrell, B.C.C., Ball, M.B. and Kearney, E.B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2761-2769
27. Davis, K.A., Hatefi, Y., Poff, K.L., Butler, W.L.: *Biochem. Biophys. Acta* 325, 341-356 (1973)
28. Von Jagow, G. and Sebald, W. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 284-314
29. Hemmerich, P., Ehrenberg, A., Walker, W.H., Erikson, L.E. G., Salach, P., Bader, P. and Singer, T.P. (1969) *FEBS Lett.* 3, 37-40
30. Singer, T.P., Kearney, E.B. and Kenney, W.C. (1973) *Advanc. Enzym.* 37, 189-272
31. Ohnishi, T., Salerno, J.C., Winter, D.B., Lim, J., Yu, C. A., Yu, L. and King, T.E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2094-2104
32. Ohnishi, T., Lim, J., Winter, D.B., King, T.E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2105-2109
33. Hatefi, Y. (1978) *Meth. Enzymol.* 53, 27-35
34. Hatefi, Y. and Stigall, D.L. (1978) *Meth. Enzymol.* 53, 21-27

35. Gutman, M. (1978) Mol. Cell. Biochem. 20, 41-60
36. Ackrell, B.A.C., Kearney, E.B. and Mayer, M. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 2021-2027
37. Gutman, M. (1976) Biochemistry 15, 1342-1348
38. Kearney, E.B., Ackrell, B.A.C., Mayer, M. and Singer,
T.P. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2016-2020
39. Gilles, R., Hogue, P. and Kearney, E.B. (1971) Life
Sciences 10, 1421-1427
40. Gutman, M., Kearney, E.B. and Singer, T.P. (1971)
Biochemistry 10, 4763-4769
41. Gutman, M., Kearney, E.B. and Singer, T.P. (1971) Bio-
chem. Biophys. Res. Comm. 42, 1016-1023
42. Kearney, E.B., Mayer, M. and Singer, T.P. (1972) 46,
531-537
43. Wojtczack, L., Wojtczack, A.B. and Ernster, L. (1969)
Biochem. Biophys. Acta 191, 10-21
44. Hopkins, F.G., Morgan, E. and Lutwak-Mann, C. (1938)
Biochem. J. 32, 1829-1834
45. Hatefi, Y., Haavik, A.G., Fowler, L.R., Griffith, D.E.:
J. Biol. Chem. 237, 1681-1685 (1962)
46. Bell, R.L., Capaldi, R.A.: Biochemistry 15, 996-1001
(1976)
47. Marres, C.A.M., Slater, E.C.: Biochem. Biophys. Acta
462, 531-548 (1977)
48. Rieske, J.S.: Biochem. Biophys. Acta 456, 195-247
(1976)
49. Gellerfors, P., Lunden, M. and Nelson, B.D. (1976)
Eur. J. Biochem. 67, 463-468
50. Weiss, H. and Ziganke, B. (1978) Methods Enzymol. 53,
212-221
51. Von Jagow, G., Schagger, H., Engel, W.D., Machleidt,
W. and Machleidt, J. (1978) FEBS Lett. 91, 121-125
52. Rieske, J.S., MacLennan, D.H. and Coleman, R. (1964)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 338-344

53. Trumpower, B.L. and Edwards, C.A. (1979) J.Biol. Chem. 254, 8697-8706
54. Von Jagow, G., Schägger, H., Engel, W.D., Riccio, P., Kolb, H.J. and Klingenberg, M. (1978) Methods Enzymol. 53, 92-98
55. König, B.W., Schilder, L.T.M., Tervoort, M.J. and van Gelder, B.F. (1980) Biochem. Biophys. Acta, in press
56. Engel, W.D., Schägger, H. and von Jagow, G. (1980) Biochem. Biophys. Acta, in press
57. Silman, H.I., Rieske, J.S., Lipton, S.H. and Baum, H. (1967) J.Biol. Chem. 242, 4867-4875
58. Ohnishi, K. (1966) J. Biochem. (Tokyo) 59, 1-8
59. Bomstein, R., Goldberger, R. and Tisdale, H. (1961) Biochem. Biophys. Acta 50, 527-543
60. Goldberger, P., Smith, A.L., Tisdale, H. and Bomstein, R. (1961) J.Biol. Chem. 236, 2788-2793
61. Eichel, B., Wainio, W.W., Person, P. and Cooperstein, S.J. (1950) J.Biol. Chem. 183, 89-103
62. Yu, C.A., Yu, L. and King, T.E. (1972) J.Biol. Chem. 247, 1012-1019
63. Sekuzu, I. and Okunuki, K. (1956) J. Biochem. (Tokyo) 43, 107-109
64. Weiss, H. and Ziganke, B. (1974) Eur. J. Biochem. 41, 63-71
65. Chance, B., Wilson, D.F., Dutton, P.L., Erecinska, M. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 1175-1182
66. Chance, B. (1972) FEBS Lett. 23, 3-20
67. Tiselius, A., Hjerten, S. and Levin, O. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 65, 132-155
68. Bernardi, G. (1971) Methods Enzymol. 22, 325
69. Smith, A.L. (1967) Methods Enzymol. 10, 81-86
70. Riccio, P., Schägger, H., Engel, W.D. and von Jagow, G. (1977) Biochem. Biophys. Acta 459, 250-262

71. Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L. and Randall, A.I. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265
72. Beisenherz, G., Bolze, H.I., Bücher, Th., Czock, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G. (1953) Z.Naturforschung 86, 555-565
73. Helenius, A. und Simons, K. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3656-3661
74. Chen, P.S., Jr., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956) Anal.Chem. 28, 1756
75. Keenan, R.W., Schmidt, G. and Tanaka, T. (1968) Anal. Bioch. 23, 555
76. Garewal, H.S. (1973) Anal.Biochem. 54, 319
77. Neville, D.M. and Glossmann, H. (1974) Methods Enzymol. 32, 92
78. Hatefi, Y. and Stempel, K.E. (1969) J.Biol.Chem. 244, 2530-2537
79. Kröger, A. (1978) Methods Enzymol. 53, 579-591
80. Fogo, J.K. and Popowsky, M. (1949) Anal.Chem 21, 732-736
81. King, T.E. and Morris, R.O. (1967) Methods Enzymol. 10 634-637
82. Brumby, P.E. and Massey, V. (1967) Methods Enzymol. 10 469-470
83. Basford, R.E., Tisdale, H.D., Glenn, J.L. and Green, D.E. (1957) Biochem.Biophys.Acta 24, 107-115
84. Chance, B. (1957) Methods Enzymol. 4, 314-320
85. Wilson, D.F. and Dutton, P.L. (1970) Biochem.Biophys. Res.Comm. 39, 59-64
86. Von Jagow, G., Schägger, H., Riccio, P., Klingenberg, M. and Kolb, H.J. (1977) Biochem.Biophys.Acta 462, 549-558
87. Capaldi, R.A. and Vanderkooi, G. (1972) Proc.Natl. Acad.Sci.USA 69, 930-932

88. Cohn, E.J. and Edsall, J.T. (1943) in *Proteins, Amino Acids and Peptides*, 370-375, Reinhold, New York
89. Machleidt, W. and Wachter, E. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 263-277
90. Machleidt, W., Hofner, H. and Wachter, E. (1975) in: *Solid-Phase Methods in Protein Sequence Analysis* (Laursen, R.A. ed.) 17-30, Pierce Chemical Co, Rockford, Il.
91. Makino, S., Reynolds, J.A. and Tanford, C. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4926
92. Robinson, N.C. and Tanford, C. (1975) *Biochemistry* 14, 369
93. Hackenberg, H. and Klingenberg, M. (1980) *Biochemistry* 19, 548
94. Simons, K., Helenius, A. and Garoff, H. (1973) *J. Mol. Biol.* 80, 119-133
95. Nozaki, Y., Schlechter, N.M., Reynolds, J.A. and Tanford, C. (1976) *Biochemistry* 15, 3884-3889
96. Tanford, C., Nozaki, Y., Reynolds, J.A. and Makina, S. (1974) *Biochemistry* 13, 2369-2376
97. Tanford, C. (1961) *Physical Chemistry of Makromolecules*, Wiley, New York
98. Schachmann, H.K. (1957) *Methods Enzymol.* IV, 32-103
99. Schachmann, H.K. and Edelstein, S.J. (1966) *Biochemistry* 5, 2681-2705
100. Svedberg, T. and Petersen, K.V. (1940) *The Ultracentrifuge*, Clarendon, Oxford
101. Yphantis, D.A. (1964) *Biochemistry* 3, 297-317
102. Yonetani, T. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1680-1688
103. Green, D.E. and Burkhard, R.K. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 92, 312
104. Yu, C.A., Yu, L. and King, T.E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4905-4910

105. Rieske, J.S. (1976) *Methods Enzymol.* Vol. X, 239-245
106. Graves, D.J. and Wang, J.H. in *The Enzymes* Vol. 7, 444
107. Rothen, A. (1944) *J. Biol. Chem.* 152, 679-693
108. Cottam, G.L., Hollenberg, P.F. and Coon, M.J. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 1481-1486
109. Deisseroth, A. and Dounce, A.L. (1970) *Physiol. Rev.*
50, 319-375
110. Kawahara, K. and Tanford, C. (1966) *Biochemistry* 5,
1578-1584
111. Derechin, M., Ramel, A.H., Lazarus, N.R. and Barnard,
E.A. (1966) *Biochemistry* 5, 4017-4025
112. Berden, J.A. and Slater, E.C. (1970) *Biochem. Biophys.*
Acta 216, 237-249
113. Wilson, D.F. and Dutton, P.L. (1970) *Biochem. Biophys.*
Res. Comm. 39, 59-64
114. Wilson, D.F., Erecinska, M., Leigh, J.S. and
Koppelman, M. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*
151, 112-121
115. Rieske, J.S., Lipton, S.H., Baum, H., Silman, H.I.
(1967) *J. Biol. Chem.* 242, 4888
116. Klingenberg, M., Riccio, P. and Aquila, H. (1978) *Bio-*
chem. Biophys. Acta 503, 193-210
117. Berden, J.A. and Slater, E.C. (1972) *Biochem. Biophys.*
Acta 256, 199-215
118. Bosshard, H.R., Zürrer, M., Schägger, H. and von Jagow,
G. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 89, 250-258
119. Ziegler, D.M., Doeg, K.A. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.*
97, 41
120. Baginsky, M.C., Hatefi, Y. (1969) *J. Biol. Chem.* 244,
5313
121. Brücke, E. *Sitz. ber. math. naturwiss. Kl. bayer. Akad.*
Wiss. München, 43, 601 (1861)
122. Zittle, C.A. (1953) *Advances in Enzymol.* 14 319
123. Moss, B. and Rosenblum, E.N. (1972) *J. Biol. Chem.* 247,
5194-5198

124. Riccio,P., Aquila,H. and Klingenberg,M. (1975) FEBS Lett. 56, 133-138
125. Klingenberg,M., Hackenberg,H., Eisenreich,G. and Mayer,I. in : Function and Molekular Aspects of Biomembrane Transport (Quagliariello,E. et al. eds.) Elsevier, North-Holland, Biomedical Press
126. Weiss,H. and Kolb,H. (1979) Eur.J.Biochem. 99, 139-149
127. Rieske,J.S., Baum,H., Stoner,C.D. and Lipton,S.H. (1967) J.Biol.Chem. 242, 4854-4866
128. Tzagoloff,A., Yang,P.L., Wharton,D.C. and Rieske,J.S. (1965) Biochem.Biophys.Acta 96, 1-8
129. Love,B., Chan,S.H.P. and Stotz,E. (1970) J.Biol. Chem. 245, 6664-6668
130. Chan,S.H.P., Love,B. and Stotz,E. (1970) J.Biol. Chem. 245, 6669-6674
131. Caughey,W.S., Wallace,W.J., Volpe,J.A. and Yoshikawa,S. (1976) in : The Enzymes XIII (Boyer,P.D. ed.) 299-344, Acad.Press
132. Robinson,N.C. and Capaldi,R.A. (1977) Biochemistry 16, 375
133. Wingfield,P., Arud,T., Leonard,K. and Weiss,H. (1979) Nature 280, 696-697
134. Von Jagow,G. and Bohrer,C. (1975) Biochem.Biophys. Acta 387, 409-424
135. Von Jagow,G. and Klingenberg,M. (1972) FEBS Lett. 24, 278-282
136. Babel,W. persönliche Mitteilung
137. Rieske,J.S. and Zaugg,W.S. (1962) Biochem.Biophys. Res.Comm. 8, 421-426
138. Wikström,M.K.F. (1973) Biochem.Biophys.Acta 301, 155-193
139. Tzagoloff,A., Macino,G. and Sebald,W. (1979) Ann. Rev.Biochem. 48, 419-444

140. Tzagoloff, A. (1980) in Biological Chemistry of
Organelle Formation
141. Barrell, B.G. persönliche Mitteilung
142. Von Jagow, G. and Engel, W.D. (1980) FEBS Lett. 111, 1-5
143. Rieske, J.S. (1967) Methods Enzymology 10, 239-245
144. Von Jagow, G., Schagger, H., Kolb, H.J., Engel, W.D.,
Becker, W.F. und Riccio, P. (1977) Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. , 358, 1379
145. Weiss, H. and Ziganke, B. (1975) in Electron Transfer
Chains and Oxidative Phosphorylation (Quagliariello
et al. eds.) North-Holland Publishing Company,
Amsterdam

LEBENS LAUF

Schägger Hermann

8 München 40, Helene-Mayer-Ring 12

geb. am 30.8.1950 in Weilheim i.OB

Eltern : Wilhelm Schägger, Fernmeldetechniker

Therese Schägger, geb. Gruber

9/1956 - 7/1960	Grundschule in Weilheim i.OB
9/1960 - 7/1969	Neusprachliches Gymnasium Weilheim
11/1969	Beginn des Chemiestudiums an der Ludwig-Maximilians Universität München
6/1975	Diplomprüfung
6/1975 - 6/1976	Diplomarbeit am Institut für Physikalische Biochemie der LMU München
8/1976 - 6/1980	Doktorarbeit am Institut für Physikalische Biochemie der LMU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. von Jagow
11/1977	Beginn des Zweitstudiums Pharmazie an der LMU München

